

博士論文番号 : 1281001

細胞接着分子 L1-CAM と細胞外基質ラミニン間の  
連結と滑りを介した軸索ガイダンスの力学的制御

阿部 幸喜

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 神経システム生物学研究室

(稲垣 直之 教授)

平成 30 年 3 月 8 日提出

## 目次

序論.....	4
材料と方法.....	7
1) 細胞培養.....	7
2) ラミニン、ポリリジンコーティング.....	7
3) 各種ベクターの作製.....	8
4) 各種ベクターの遺伝子導入方法.....	12
5) HEK293T 細胞を用いた pEGFP-L1-CAM wild type refractory #1、pEGFP- $\Delta$ T273 L1-CAM refractory #1 の発現解析.....	12
6) L1-CAM-WT-ECD-Flag-His、 $\Delta$ T273-L1-CAM-ECD-Flag-His タンパク質の精製方法 14	
7) L1-CAM とラミニン間の <i>in vitro</i> binding アッセイ.....	14
8) ラミニン/ポリリジン ストライプアッセイ.....	15
9) マイクロパターンニングアッセイ.....	15
10) 牽引力顕微鏡.....	17
11) mRFP-actin、EGFP-shootin1a のイメージング.....	18
12) ポリリジン及びラミニン各基質上における L1-CAM wild type halotag と EGFP-actin のイメージング.....	18
13) ラミニン/ポリリジン境界の同一の成長円錐における L1-CAM wild type halotag のイメージング.....	18
14) $\Delta$ T273 L1-CAM 発現時における EGFP-shootin1a の逆行性移動動態の解析.....	19
15) $\Delta$ T273 L1-CAM halotag の逆行性移動動態の解析.....	19
16) 軸索形成の数理解析モデルを用いた数理解析.....	19
結果.....	22
1) ラミニン上における軸索伸長機構.....	22
2) Shootin1a はラミニンに誘導される軸索形成に必要である.....	22
◆ Shootin1a、Cortactin および L1-CAM はラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに関与する.....	23
◆ ミオシン II およびアクチン重合の阻害はラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスを抑制する.....	23
3) Shootin1a DN (ドミナントネガティブ)変異体により Shootin1a を介したクラッチ連結を阻害すると、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスが抑制される...	24
4) ラミニンによって成長円錐が生み出す牽引力は強められる.....	25
5) ラミニン上の成長円錐において、mRFP-actin、EGFP-shootin1a の逆行性移動速度が減少する.....	25

6)	L1-CAM は逆行性移動の過程において、ポリリジンと比べて、ラミニン上でグリップを強める .....	26
7)	同一の成長円錐において、L1-CAM はポリリジンと比べてラミニン上でグリップを強める .....	27
8)	牽引力発生時に生じる分子間の滑りは、主に L1-CAM と細胞外基質ラミニン間で生じる .....	28
9)	Shootin1a を介した牽引力制御システムは、ラミニンに誘導される軸索形成に関与する .....	29
10)	ヒト L1 症候群患者で新規に同定された $\Delta T273$ L1-CAM 変異により、野生型 L1-CAM と比べて、 $\Delta T273$ L1-CAM とラミニン間の相互作用が減少する (馬場健太郎博士との共同実験).....	29
11)	ヒト L1 症候群患者で新規に同定された $\Delta T273$ L1-CAM 変異体のラミニン上におけるグリップは低下する.....	30
12)	$\Delta T273$ L1-CAM 変異により Shootin1a の逆行性移動速度は速まる.....	31
13)	$\Delta T273$ L1-CAM 変異によりラミニン上の成長円錐における牽引力は減少する ....	31
◆	$\Delta T273$ L1-CAM 変異により、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスが抑制される .....	32
14)	$\Delta T273$ L1-CAM 変異により、ラミニン/ポリリジン境界におけるラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスが抑制される.....	32
	考察.....	34
1)	ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスのメカニズムについて.....	34
2)	L1-CAM とラミニン間の連結と滑りを介した軸索ガイダンスメカニズムの新規性について.....	35
3)	$\Delta T273$ L1-CAM 変異による L1 症候群発症メカニズム .....	36
4)	結論.....	37
5)	参考資料.....	38
	謝辞.....	39
	参考文献.....	40
	図表.....	46

## <序論>

正確な場所への細胞移動は、胚形成、軸索ガイダンス、免疫応答や組織修復といった様々な生物学的過程を支える重要な生命現象である。細胞が正確に移動するためには、細胞と細胞外微小環境間の相互作用が重要であり、そのメカニズムが近年、明らかになりつつある。例えば、ショウジョウバエのボーダー細胞クラスターは細胞外基質との接着により、細胞が動く為に必要な牽引力を強め卵母細胞へと移動する (Cai et al., 2014)。大脳新皮質の興奮性神経細胞は、中間帯の下方において、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する TAG-1 を介した、未成熟な突起とパイオニア軸索間の接着により、パイオニア軸索の走行方向へ軸索を伸長させる (Namba et al., 2014)。このように細胞が細胞の足場にある化学物質を認識することで、細胞運動を活性化し、方向性を持った移動を示す性質を走触性 (Haptotaxis) という (Carter et al., 1967)。

ラット海馬神経細胞は高度に極性化した細胞であり、複数の樹状突起と一本の軸索を形成する。軸索及び樹状突起の形成を含むラット培養海馬神経細胞の発生過程は、5つの Stage に分類することができる (Dotti et al., 1988)。まず、始めにラット培養海馬神経細胞は、細胞体の辺縁にラメリポディアを形成する (Stage1)。続いて、ラメリポディアから複数の未成熟な突起 (マイナープロセス) が形成される (Stage2)。その後、一つのマイナープロセスが急激に伸長し軸索に分化する (Stage3)。続いて、軸索を除くその他複数の突起が伸長して樹状突起へ分化する (Stage4)。最終段階として、神経細胞は、細胞体、樹状突起及び軸索においてシナプスを形成して成熟する (Stage5) (Dotti et al., 1988)。このように、ラット培養海馬神経細胞は多段階の発生過程を経て、特徴的な形態を獲得する。更に、海馬神経細胞は、軸索を標的細胞へ投射することで、記憶、学習、空間把握などの機能を発現するための、神経回路を構築する。神経回路を形成するためには、軸索は正しい経路を移動するようにガイダンス制御を受ける必要がある。

軸索は、走化性 (Chemotaxis) 及び走触性 (Haptotaxis) によるガイダンス制御を受ける (Lowery et al, 2009)。走化性による軸索ガイダンス制御とは、軸索ガイダンス分子が細胞外に分泌され、拡散することで軸索を誘引、もしくは反発し、標的細胞へと導く機構である。誘引活性を示す軸索ガイダンス分子の一つとして Netrin、その受容体として Deleted in Colorectal Cancer (DCC) が同定されている (Cirulli et al., 2007)。軸索伸長を促進する分子として、Shootin1a が報告されている。Shootin1a は脳に特異的に発現するクラッチ分子であり、アクチン線維と細胞接着分子 L1-CAM 間を連結する事で、成長円錐が移動する為に必要な牽引力を生み出す (Toriyama et al., 2006 ; Shimada et al., 2008 ; Higashiguchi et al., 2016)。

Netrin-1 は成長円錐に作用することで、クラッチ分子 Shootin1a のリン酸化を促進する (Toriyama et al., 2013)。リン酸化 Shootin1a は、Cortactin との相互作用を強めることで、アクチン線維と L1-CAM 間の連結を強化し、軸索伸長の為の牽引力を生み出す (Kubo et al., 2015)。反発活性を示す軸索ガイダンス分子の一つとして Semaphorin、またその受容体に Neuropilin、Plexin がある。Semaphorin3A は Neuropilin/PlexinA 複合体を介して、Cofilin 活性を制御し、アクチン線維に影響を与えることで、軸索の反発活性を誘導すると考えられている (Huber et al., 2003)。

一方で、走触性による軸索ガイダンス制御は、成長円錐とその足場に局在する化学物質間の接触を介して、成長円錐の運動性を制御し、軸索を正しい方向へと導く機構である。走触性を制御する細胞外基質タンパク質の一つとしてラミニンが知られている (Dertinger et al., 2002)。ラミニンとポリリジンが交互に並んだ基質上に神経細胞を培養した場合、神経細胞のマイナープロセスが、ラミニンと接触すると、ラミニンが局在する方向へ軸索が形成される (Esch et al., 1999)。また、ゼブラフィッシュの網膜神経節細胞の軸索は、ラミニンと接触することで、基底膜方向へ伸長する (Randlett et al., 2011)。このように、ラミニンは成長円錐の走触性を制御して軸索を誘導する。しかしながら、ラミニンによる走触性の制御を介した軸索ガイダンスのメカニズムの理解は進んでいない。

軸索伸長及び軸索ガイダンスにおいて、牽引力は重要な要素であると考えられている。例えば、未成熟な神経突起をガラス針で引張ると、その突起が特異的に長く伸長し、軸索となるという報告がある (Lamoureux et al., 2002)。また、軸索ガイダンス分子 Netrin は、Shootin1a のリン酸化を促進し、Cortactin との連結を強めることで、成長円錐の生み出す牽引力を増強し、軸索伸長を促進する (Toriyama et al., 2013 ; Kubo et al., 2015)。更に、成長円錐に局在する N-cadherin はその足場に局在する N-cadherin とホモフィリックに相互作用することで、 $\alpha$  及び  $\beta$ -catenin を介して、アクチン線維の運動エネルギーを基質に伝えることが知られている (Garcia et al., 2015)。成長円錐が牽引力を発生させるためには、アクチン線維の逆行性移動によって生み出される運動エネルギーを足場に伝えることが必要であり、細胞接着分子を介した成長円錐と細胞外基質間の接着が重要であると考えられる。

ラミニンは、マウス EHS (Engelbreth-Holm-Swarm)肉腫から単離された基底膜の主要な構成成分で (Timpl et al., 1979)、細胞接着、移動、分化に重要な役割をはたす (Cell Biology of Extracellular Matrix Second Editon, 1991)。ラミニンは、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  鎖から構成され、十字形のヘテロ 3 量体構造を形成する分子量約 900kDa の巨大な糖タンパク質である。ラミニンは胚生期の脳において、海馬錐体細胞層、大脳皮質の脳室帯、及び髄膜等に局在している (Chen et al., 2003 ; Lathia et al.,

2007)。ラミニン  $\gamma 1$  をノックアウトしたマウスでは、脳梁の軸索の一部が正中を越えずに、大脳皮質の分子層方向へ異所的な投射を示すというガイダンス異常の表現型が確認されており、ラミニンが軸索ガイダンスを制御することが示唆されている (Chen et al., 2009)。

細胞接着分子 L1-CAM は、一回膜貫通型のタンパク質であり、6つの免疫グロブリン様ドメインと5つのファイブロネクチン III ドメインから構成される。L1-CAM は、神経細胞の成長円錐に局在し、軸索形成を促進する (Lemmon et al., 1989)。また、本研究室で同定された Shootin1a (Toriyama et al., 2006) は、成長円錐において逆行性移動を示すアクチン線維を L1-CAM を介して細胞外基質へ連結することで、軸索が伸長する為の牽引力を発生させ軸索を誘導する (Shimada et al., 2008)。成長円錐の L1-CAM は、細胞外でラミニンと結合する (Hall et al., 1997)。この分子間相互作用により、成長円錐内で生み出される運動エネルギーが細胞外基質に伝わり、牽引力が発生すると考えられる。

L1-CAM における遺伝子変異は、L1 症候群と呼ばれる遺伝子疾患の発症の原因となると考えられている (Patzke et al., 2016)。L1 症候群は、X 連鎖劣性遺伝病であり、罹患者は、左右の大脳半球を連結する軸索から構成される脳梁の形成不全、水頭症、下半身麻痺、内転母子、精神遅滞といった症状を示す (Fransen et al., 1997; Kamiguchi et al., 1998)。L1-CAM mutation のデータベースでは、L1-CAM 遺伝子における塩基の欠失や挿入、重複、ミスセンス及びナンセンス変異、スプライシング異常などの変異の種類と、それによって発症する症状に関する知見が蓄積されている (Yvonne Vos, University Medical Center Groningen, The Netherlands)。L1-CAM は一回膜貫通型の膜タンパク質であるが、特に細胞外基質と直接相互作用し、細胞接着に重要な機能を持つ細胞外ドメインにおける変異が、重篤な症状を引き起こすと考えられている (Cheng et al., 2004)。L1 症候群患者において、脳梁及び皮質脊髄路の低形成が観察されている (Welniarz et al., 2016)。更に、L1-CAM ノックアウトマウスの皮質脊髄路において、異常な錐体交叉が観察されている (Cohen et al., 1998) ことから、L1-CAM を介した走触性制御の欠損による軸索ガイダンス異常が、L1 症候群の発症に関与している可能性が考えられる。

以上の知見から、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスにおいて、成長円錐がラミニンと接すると、成長円錐の L1-CAM とラミニン間が連結することで強い牽引力が発生し、ラミニンが局在する方向へ軸索がガイダンスされるといふメカニズムの関与が考えられる。更に、ラミニンによる L1-CAM を介した走触性制御機構の障害が、L1 症候群発症の原因となる可能性がある。本研究では、実験的手法、数理モデルを用いて、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンス及び L1 症候群発症の分子メカニズムを明らかにすることを旨とした。

## <材料と方法>

### 1) 細胞培養

#### ・海馬神経細胞の初代培養

胎生 18 日目のラット (日本 SLC、日本クレア)の全脳を取り出し、グルコース溶液 (0.4% Glucose を含む PBS (pH 7.4, GIBCO))中に回収した。その後、実体顕微鏡 (Nikon C-DS、C-BD115)下で、海馬を採取し、Solution A+溶液 (0.18% Glucose, 0.1% BSA (Sigma), 0.0012% DNase (Sigma), 0.05% Papain (ナカライ) を含む PBS pH 7.4)中に回収した。20 分間、37°Cでインキュベートした後、Solution A-溶液 (0.18% Glucose, 0.1% BSA, 0.0012% DNase を含む PBS pH 7.4)に置換し、パストツールを用いてピペッティングにより細胞を解離した。その後、20 分間、37°Cの条件でインキュベートし、パストツールを用いて溶液中のゲノム DNA を絡め取り、除去した。4°C、3000rpm、3 分間の条件で、遠心し、上清を除去した後、PBS を 5ml 加え懸濁した。懸濁した神経細胞を含む PBS 溶液 10 $\mu$ l にトリパンブルー (Nacalai tesque) 10 $\mu$ l を加え、血球計算盤 (PerkinElmer)を用い細胞数をカウントした。続いて、4°C、3000rpm、3 分間の条件で遠心し、細胞を回収した。その後、遺伝子導入する場合は、エレクトロポレーション法により各種プラスミドを海馬神経細胞へ導入した。10% FBS (Gibco)を含む Neurobasal 培地 (Gibco)を細胞に加え、適切な細胞数へ調製し、37°Cで 3 時間培養した。その後、2% B-27 Supplement (Gibco)、1mM Glutamine (Nacalai tesque)、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution (Nacalai tesque)を含む Neurobasal 培地へ置換し、37°Cで培養した。

#### ・HEK293T 細胞の培養

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞株である HEK293T 細胞は 10% FBS、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution、0.01% Gentamycin (Gibco)を含む DMEM 培地 (Gibco)を用いて、接着性細胞培養用の 10cm ディッシュ (Greiner)上に培養した。

### 2) ラミニン、ポリリジンコーティング

#### ・ラミニンコーティング

直径 13mm, 18mm の丸カバーグラス (松浪硝子工業)は 70%エタノールで洗浄し、硝酸を用いて一晚処理した後、225°C、6 時間、乾熱滅菌して用意した。コーティングの都度、PBS でカバーグラスを 3 回洗浄し、100 $\mu$ g/ml のポリリジン (Poly-D-lysine、Sigma) をのせ、37°C、一晚インキュベートした。なお、ガラス直径 14mm, 27mm のガラスボトムディッシュ (松浪硝子工業)を用いる場合は、PBS による洗浄をせずに、ポリリジン (100  $\mu$ g/ml)をのせ、37°C、一晚インキュ

ベートした。その後、PBS で3回洗浄し、25 µg/ml のラミニン溶液（和光純薬工業）をカバーガラスもしくはガラスボトムディッシュ上にのせ、37°C、一晩インキュベートした。インキュベート後は、PBS で3回洗浄し、細胞培養に使用した。

#### ・ポリリジンコーティング

PBS でカバーガラスを3回洗浄し、100 µg/ml のポリリジンをのせ、37°C、一晩インキュベートした。ガラスボトムディッシュを使用する場合は、PBS で洗浄せずに、100 µg/ml のポリリジンをのせ、37°C、一晩インキュベートした。インキュベート後、PBS で3回洗浄し、細胞培養に使用した。

### 3) 各種ベクターの作製

#### ・CFP-Shootin1a miRNA 発現ベクターの作製

各 Shootin1a miRNA #1、#2 発現ベクター (Toriyama et al., 2006) を鋳型に、NotI の制限酵素認識配列を付与した forward プライマー :pECFP-shootin1-f (NotI) と NheI の制限酵素認識配列を付与した reverse プライマー :pECFP-shootin1-r (NheI) のプライマーセット (表 2)、DNA 合成酵素に KOD plus Neo (Toyobo) を用いて、PCR 反応を行った。その後、PCR 産物を精製し、NheI (Toyobo)、NotI (Toyobo) を用いて、それぞれ、37°C、3 時間、制限酵素処理を行った。続いて、pECFP ベクター (Clontech) を鋳型に、NheI の制限酵素認識配列を付与した forward プライマー : CFP-f (NheI) と NotI の制限酵素認識配列を付与した reverse プライマー : CFP-r (NotI) のプライマーセット (表 2)、DNA 合成酵素に KOD plus Neo (Toyobo) を用いて PCR 反応を行い、CFP の翻訳領域を増幅させた。PCR 産物を精製し、NheI、NotI を用いて、それぞれ 37°C、3 時間、制限酵素処理を行った。制限酵素処理したベクターとインサートを Ligation high ver.2 (Toyobo) を用いて、4°C、一晩、ライゲーション反応させた。ライゲーション産物を DH5α に導入し形質転換させた後、Spectinomycin を含む LB (Luria-Bertani) 寒天培地にプレーティングし、37°C、一晩培養した。形成されたコロニーを LB 液体培地を用いて、37°C、一晩培養し、FastGene Plasmid Mini Kit (Nippon gene) を用いて、プラスミドを回収した。得られたプラスミドをシークエンスし、CFP の翻訳領域と Shootin1a miRNA の標的配列、Shootin1a miRNA 発現ベクターのプロモーターに変異が入っていないことを確認した。なお、シークエンスに使用したプライマーは表 2 に示した。

#### ・pEGFP-ΔT273 L1-CAM refractory #1 の作製

本研究では、L1-CAM のイメージングに Human の L1-CAM (Ramon Vance 研究室による提供) を使用しているが、L1 miRNA #1 の標的配列と相同性の高い領域



が human L1-CAM の 442 から 462 bp に存在する。この領域は、L1 miRNA #1 の標的配列と比べて 3 塩基のミスマッチがある (表 1)。L1 miRNA #1 による発現抑制効果の影響を防ぐ為、アミノ酸配列に変化が生じないように、塩基配列を改変した pEGFP L1-CAM wild type miRNA #1 refractory ベクターが、本研究室で既に構築されている (表 1, L1-CAM wild type refractory #1)。

**表1. L1-CAM miRNA #1の標的配列とL1-CAM wild type refractory #1 配列の違い**

Rat L1 miRNA #1 target	GTG GAG GAA GGA GAA TCA GTA
Human-L1	GTG GAG GAA GGG GAG TCA GTG
L1-CAM wild type refractory #1	GTC GAA GAA GGG GAG AGC GTG

QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies)を使用して、L1 miRNA #1 に耐性があり、273 番目のスレオニンが欠失した L1-CAM 変異体を作製した。まず、L1-CAM 遺伝子のコドン 817 から 819 の塩基配列 (c.817-819, ACC) を欠失した L1-CAM に対するプライマー : L1CAM-Del817-819-top と逆鎖のプライマー : L1CAM-Del817-819-bottom を設計し (表 3)、pEGFP-L1-CAM wild type refractory #1 を鋳型に、*Pfu Turbo* DNA 合成酵素を用いて、PCR を行った。PCR 反応後、鋳型に使用した pEGFP-L1-CAM wild type refractory #1 を除去するため、制限酵素 *DpnI* で 37°C、3 時間処理した。この反応液から DNA を精製後、大腸菌 NEB5α にトランスフォーメーションし、Kanamycin を含む LB 寒天培地にプレーティングし、37°C、一晩インキュベートした。形成したコロニーを 37°C、一晩の条件で、LB 液体培養し、FastGene Plasmid Mini Kit を用いて、プラスミドを抽出した。得られたプラスミドに含まれる L1-CAM 配列の全長をシーケンスし (プライマーリストは表 3 参照)、c.817-819 が欠失していること、c.817-819 の欠失以外に変異が生じていないことを確認した。その後、pEGFP-ΔT273 L1-CAM refractory #1 のコード領域を pEGFP-L1-CAM wild type ベクターにサブクローニングした。

#### ・ pFC14K-L1-CAM wild type refractory #1, pFC14K-ΔT273 L1-CAM refractory #1 の作製

pEGFP-L1-CAM wild type refractory #1、pEGFP-ΔT273 L1-CAM refractory #1 を鋳型に、*SpfI* の制限酵素認識配列を付与した forward プライマー : L1-HaloTagFW (*SgfI*)と *PmeI* の制限酵素認識配列を付与した reverse プライマー : L1-HalotagRV (*PmeI*) を用いて (表 4)、PCR を行った。得られた PCR 産物を FastGene Gel/PCR Extraction kit を用いて精製した。精製した PCR 産物を、*SgfI*、*PmeI* を含む 10× Flexi Blend (Promega)を用いて、37°C、1 時間、制限酵素処理した。その後、10× Flexi Blend で処理した反応溶液を FastGene Gel/PCR Extraction kit (Nippon genetics) を用いて精製した。一方で、pFC14K ベクターを、*EcoICRI*、*SgfI* を含む Carboxy

Flexi Enzyme Blend (Promega)を用いて、37°C、30 分間、制限酵素処理した。制限酵素処理した pFC14K ベクターを含む溶液とインサートを混合し、T4 DNA ligase (Takara)を用いて、16°C、一晩の条件で、ライゲーション反応を行った。ライゲーション産物を用いて、大腸菌 NEB5 $\alpha$  を形質転換後、カナマイシンを含む LB 寒天培地上にプレーティングし、37°C、一晩の条件で培養した。形成されたコロニーを用いて、Colony direct PCR を行い、インサートの有無を確認した。インサートが挿入されたプラスミドを保有すると考えられるコロニーを 37°C、一晩、LB 液体培養し、FastGene Plasmid Mini Kit を用いて、プラスミドを抽出した。得られたプラスミドにおける  $\Delta$ T273 L1-CAM のコード領域全長及びベクターと  $\Delta$ T273 L1-CAM の繋ぎ目をシークエンスし、コンストラクト作製過程で L1-CAM に予期せぬ変異が入っていないことを確認した。

#### ・サイクルシークエンス反応

各種プラスミド DNA を鋳型に各種シークエンスプライマー (1.6 $\mu$ mol)、BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied biosystems)を用いて、シークエンス反応を行った。反応産物をエタノール沈殿により精製し、室温で 30 分間、乾燥後、HiDi ホルムアミドを加えた。95°C、2 分間加熱後、氷上で冷却させた。96 穴プレートに分注し、DNA シークエンサー ABI3130xl genetic analyzer (Applied biosystems)により、DNA の塩基配列解析を行った。

#### ・ pCAGGS-L1-CAM-WT-ECD FLAG-His, pCAGGS- $\Delta$ T273 L1-CAM-ECD FLAG-His ベクターの作製

Flag と His タグが付加された L1-CAM 細胞外ドメインを発現するベクターを作製するため、BirA 認識部位、HRV3C プロテアーゼ認識部位、3 $\times$ FLAG、10 $\times$ His タグなどの複数のタグをコードする二重らせん DNA 配列を設計した (BirA-HRV3C-3flag-his)。設計した DNA 配列はユーロフィンジェノミクス(株)によって合成された。

BirA-HRV3C-3flag-his :

```
GGCGGCGGACTCAACGACATATTCGAGGCCAGAAAATCGAGTGGCACGAA
GGAGGTGGGCTGGAAGTGCTGTTTCAAGGGCCCGGAGGAGGCGATTACAAG
GATCATGATGGGGACTATAAGGATCACGACATTGACTACAAGGATGATGACG
ACAAAGGCGGTGGCCATCACCACCACCATCACCATCACCAC,
```

上記の DNA 配列を BirA-Fw、BirA-Rw プライマーを用いて (表 5)PCR 法により増幅し、得られた PCR 産物を NotI、EcoRI による制限酵素処理後、pCAGGS-L1-CAM-Fc ベクターの Fc 領域へ置換した。続いて、Flag-His タグが付与された

ΔT273 L1-CAM 細胞外領域を作成するため、L1-CAM 5'-ECD プライマーと L1-CAM transmembrane プライマーを用いて (表 5)PCR 法により、ΔT273 L1-CAM のコード配列を増幅し、増幅した PCR 産物を pCAGGS-L1-CAM-WT-ECD FLAG-His ベクターの L1-CAM 細胞外ドメインのコード配列と置換し、pCAGGS-ΔT273-L1-CAM-ECD FLAG-His を作製した。

表2. CFP-shootin1 miRNAベクターの作製

プライマー名	塩基配列
pECFP-shootin1-f (NotI)	TTTGC GGCCGCGCTAAGCACTTCGTGGCCGT
pECFP-shootin1-r (NheI)	CCAGCTAGCGCCTGCTTTTTTGTACAAACT
CFP-f (NheI)	AAAGCTAGCACCATGGTGAGCAAGGGCGA
CFP-r (NotI)	CCCGCGGCCGCTTATCTAGATCCGGTGGATCC
pECFP-f-seq	TGCCCAGTACATGACCTTAT
pECFP-r-seq	AGCCCTGGGCCTTCACCCGA

表3. pEGFP-ΔT273 L1-CAMの作製

プライマー名	塩基配列
L1CAM-Del817-819-top	GAGGGCTTTCCCACGCCATCAAATGGCTGCGCCCCAGTG
L1CAM-Del817-819-bottom	CACTGGGGCGCAGCCATTTGATGGGCGTGGGAAAGCCCTC
pEGFP-N1 Forward	GTAGGCGTGTACGGTGGGAG
pEGFP-N1 Reverse	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
humanL1CAM_500FW	CCGATCTACTGGATGAACAGCAAGATCTT
humanL1CAM_1000FW	ACTGGCTGCACAAGCCCCAGAGCCATCTAT
humanL1CAM_1500FW	AATGACCAAAACAATGTTACCATCATGGCT
humanL1CAM_2000FW	GGTTCAGGGAACAGACCTCTACCACCCT
humanL1CAM_2500FW	ACCTCCGCGGATACAATGTGACGTA CTGGA
humanL1CAM_3000FW	TCTCCTGGGTCCCCAAGGAGGGCCAGTGCA

表4. pFC14K L1-CAM wild type、pFC14K ΔT273 L1-CAMの作製

プライマー名	塩基配列
L1-HaloTagFW (SgfI)	TTTTTGC GATCGCCATGGTCGTGGCGCTGCGGTA
L1-HaloTagRV (PmeI)	TTTTTGTITAAACTTCTAGGGCCACGGCAGGGTT
pFC14K-seq-5'FW	TCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCT

表5. pCAGGS-L1-CAM-WT-ECD FLAG-His、pCAGGS-ΔT273 L1-CAM-ECD FLAG-Hisの作製

プライマー名	塩基配列
BirA-Fw	TTAAGGATCCATGAAGGATAACACCGTGCCAC
BirA-Rw	TTAACTCGAGTTATTTTTCTGCACTACGC
L1-CAM 5'-ECD	TTAAGTCGACGCCACCATGGTCGTGGCGCT
L1-CAM transmembrane	TTAAGCGGCCG CAGGGAGCCTCACGCGGCC

#### 4) 各種ベクターの遺伝子導入方法

##### ・エレクトロポレーション法を用いた神経細胞への遺伝子導入

Rat Neuron Nucleofector Kit (Lonza)を用いて、各種ベクターを神経細胞に導入した。まず、Nucleofector solution に Supplement を加えた。次に、調製した Nucleofector solution を海馬神経細胞  $1 \times 10^6$  cell あたり 100 $\mu$ l 加え、必要量の DNA を添加した。続いて、細胞と DNA を含む溶液をアルミニウムキュベットへ移し、Nucleofector 装置 (Lonza) のプログラム O-003 を用いて、エレクトロポレーションを行った。

##### ・リン酸カルシウム法を用いた HEK293T 細胞への遺伝子導入

HEK293T 細胞を接着性細胞培養用の直径 6cm ディッシュ (Grainer) へ撒き、70 から 80% コンフルエントになるまで、37 $^{\circ}$ C で培養を行った。滅菌水 440 $\mu$ l、各種プラスミド DNA 2 $\mu$ l、CaCl<sub>2</sub> 50 $\mu$ l を混合した。プラスミドを含む溶液を、パストールを用いて、バブリングしながら、2 $\times$ BES 溶液 (50mM BES(C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>S), 280mM NaCl, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH6.94) 500 $\mu$ l を、一滴ずつ加えた。2 $\times$ BES 溶液を加えた後、更に 1 分間、バブリングを行い、室温で 30 分間静置した。静置後、培養培地中に、プラスミドを含むリン酸カルシウム溶液を加え、37 $^{\circ}$ C、一晚培養を行った。

##### ・ポリエチレンイミン (Polyethylenimine, PEI)を用いた HEK293T 細胞への遺伝子導入

PEI 30 $\mu$ l を DMEM 培地 (1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution、0.01% Gentamicin を含む) 500 $\mu$ l に加え、よく混合し、室温で静置させた。また、必要量の各プラスミドを DMEM 培地 500 $\mu$ l に加え、よく混合し、室温で静置させた。続いて、二つの溶液を混ぜ、室温で 20 分間静置させた。その後、プラスミドを含む溶液を HEK293T 細胞の培養シャーレに加え、37 $^{\circ}$ C、24 時間、インキュベートした。

#### 5) HEK293T 細胞を用いた pEGFP-L1-CAM wild type refractory #1 、 pEGFP- $\Delta$ T273 L1-CAM refractory #1 の発現解析

##### ・HEK293T 細胞における L1-CAM wild type refractory #1 EGFP、 $\Delta$ T273 L1-CAM refractory #1 EGFP の局在の確認

pEGFP-L1-CAM wild type、pEGFP-L1-CAM wild type refractory #1、pEGFP- $\Delta$ T273 L1-CAM refractory #1 をリン酸カルシウム法を用いて、HEK293T 細胞に遺伝子導

入した。その後、ポリリジンコートしたカバーガラス上に各コンストラクトをトランスフェクションした HEK293T 細胞を 1 ディッシュあたり、 $2 \times 10^5$  cells を撒き、 $37^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した。その後、氷上において、遺伝子導入した HEK293T 細胞を 3.7% ホルムアルデヒド溶液を用いて固定し、PBS で 3 回洗浄した。続いて、0.05% Triton-X を加え、氷上で、15 分間、透過処理を行った。PBS で 3 回洗浄し、室温、10 分間、DAPI ( $1\mu\text{g/ml}$  DAPI、1% FBS を含む PBS 溶液)処理を行い、PBS で洗浄後、50% Glycerol を含む PBS 溶液を用いて、スライドガラス上にマウントした。共焦点顕微鏡 LSM700 (ZEISS)を用いて、HEK293T 細胞における L1-CAM wild type EGFP、L1-CAM wild type refractory #1 EGFP、 $\Delta\text{T273}$  L1-CAM refractory #1 EGFP の局在を観察した。

#### ・ウエスタンブロットによる L1-CAM wild type refractory #1 EGFP、 $\Delta\text{T273}$ L1-CAM refractory #1 EGFP の分子サイズの確認

pEGFP-L1-CAM wild type、pEGFP-L1-CAM wild type refractory #1、pEGFP- $\Delta\text{T273}$  L1-CAM refractory #1 をリン酸カルシウム法により、HEK293T 細胞に遺伝子導入し、 $37^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した。その後、PBS で洗浄し、10% FBS を含む DMEM 培地を加え、更に  $37^\circ\text{C}$ 、24 時間培養した。培養液を除去し、PBS で洗浄後、RIPA バッファー (50mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM DTT、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate) を  $300\mu\text{l}$  加え、スクレイパーを用いて、氷上でライセートを回収した。回収したライセートを氷上で 10 分間静置後、 $4^\circ\text{C}$ 、15000rpm、10 分間の条件で、遠心分離した。遠心分離した溶液の上清  $180\mu\text{l}$  を  $1.5\text{ml}$  エッペンチューブに移し、 $5\times$  サンプルバッファーを  $20\mu\text{l}$  加えた後、 $95^\circ\text{C}$ 、4 分間、熱処理した。

続いて、6% ポリアクリルアミドゲルを調製し、熱処理したサンプルを  $10\mu\text{l}$  ローディング後、SDS バッファー中で、電気泳動を行った。その後、PDVF 膜上にゲルを置き、90 分間、転写反応を行った。転写反応後、PDVF 膜を 2% スキムミルク TBS・T を用いて、室温、1 時間インキュベートし、ブロッキングを行った。その後、一次抗体:ラビット抗 GFP 抗体を 2% スキムミルクを含む TBS・T 溶液を用いて、2000 倍希釈し、 $4^\circ\text{C}$ 、一晩の条件で、一次抗体処理を行った。一次抗体処理後、TBS・T で 3 回洗浄し、二次抗体:抗ラビット HRP 標識抗体を 1% スキムミルクを含む TBS・T を用いて、2000 倍希釈し、室温、1 時間インキュベートし、二次抗体処理を行った。二次抗体処理後、TBS・T で 3 回洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)を用いて、室温、一分間、メンブレンを処理し、反応を行った。その後、シグナルを X 線フィルムに感光させて、バンドパターンを検出した。

## 6) L1-CAM-WT-ECD-Flag-His、 $\Delta$ T273-L1-CAM-ECD-Flag-His タンパク質の精製方法

pCAGGS-L1-CAM-wild type-ECD FLAG-His, pCAGGS- $\Delta$ T273-L1-CAM-ECD FLAG-His ベクターを PEI を用いて HEK293T 細胞に遺伝子導入し、37°C、24 時間培養後、培養上清を除き、PBS で洗浄した。続いて、FBS を含まない DMEM 培地 (1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution、0.01% Gentamycin を含む) を 8ml 加え、37°C、48 時間培養した。培養上清を回収して、4°C、4700rpm、15 分間遠心後、上清を回収した。すぐに精製に移らない場合は、液体窒素で凍結し、-80°C で凍結保存した。

回収した培養上清を Ni Sepharose excel column (GE Healthcare) を充填したカラムへ注ぎ、通過させた。洗浄バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) でカラムを洗浄後、溶出バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 200 mM imidazole) でカラムに結合したタンパク質を溶出した。溶出した溶液は、HBS バッファー (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl) 中で、4°C、一晚透析した。透析後は、200 $\mu$ l エッペンチューブに分注し、液体窒素で瞬間凍結後、-80°C で凍結保存した。

## 7) L1-CAM とラミニン間の *in vitro binding* アッセイ

精製した L1-CAM-WT-ECD Flag-His、 $\Delta$ T273-L1-CAM-ECD Flag-His (100nM) 250 $\mu$ l に精製ラミニン (500、100、50、10、0nM) 各 250 $\mu$ l 加え、4°C、一晚インキュベートした。反応バッファー (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 10mM imidazole) であらかじめ平衡化した Ni-NTA agarose beads 30 $\mu$ l にラミニンと L1-CAM-ECD の混合液を 500 $\mu$ l 加え、4°C、2 時間インキュベートした。その後、洗浄バッファーを 1ml 加え、転倒混和により攪拌し、4°C、3000rpm、30 秒間遠心し、上清を除いた。この洗浄操作を 3 回繰り返した後、溶出バッファー (20mM Tris-HCl, pH 8.0, 300mM NaCl, 200mM imidazole) を 25 $\mu$ l 加え、4°C、2 時間インキュベートし、結合したタンパク質を溶出した。4°C、3000rpm、30 秒間遠心後、上清を回収し、5 $\times$ SDS サンプルバッファーを加えて懸濁し、95°C、5 分間、熱処理を行った。SDS 処理したサンプル 20 $\mu$ l を 7%SDS-PAGE ゲルにロードし電気泳動を行った。ウエスタンブロッティングにより、ニトロセルロース膜へタンパク質を転写し、抗ラミニン抗体 (1:1000)、抗 FLAG 抗体 (1:1000) を用いて 4°C、一晚の条件で、一次抗体処理を行った。一次抗体処理後、TBS $\cdot$ T で 3 回洗浄し、二次抗体:抗ラビット HRP 標識抗体を 1% スキムミルクを含む TBS $\cdot$ T を用いて、2000 倍希釈し、室温、1 時間インキュベートし、二次抗体処理を行った。二次抗体処理後、TBS $\cdot$ T で 3 回洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて、室温、一分間、メンブレンを処理し、反応を行った。その

後、LAS4000 を用いて、ECL のシグナルを検出した。

## 8) ラミネン/ポリリジン ストライプアッセイ

硝酸処理したカバーガラスを PBS で 3 回洗浄し、ポリリジンコーティングを行った。その後、PBS で 3 回洗浄し、2 時間乾燥させた。ストライプ状の凹構造が施された PDMS をポリリジンコートしたカバーガラス上に載せ、0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TexasRed conjugated BSA を含むラミネン溶液を PDMS 中に注入した。37°C、一晩インキュベートした後で、PBS で 3 回洗浄し、アッセイに使用した。

海馬神経細胞に Control miRNA、Shootin1a miRNA 発現ベクターを遺伝子導入し、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地中で、37°C、24 時間、浮遊培養を行った。その後、細胞を回収し、ストライプコートした基質上で 10%FBS を含む Neurobasal 培地を用いて、3 時間、培養した。続いて、培養上清を回収し、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地中で、37°C、3 日間、培養した。3.7% ホルムアルデヒドを含む PBS 溶液で固定し、一次抗体:ニワトリ抗 GFP 抗体 (1:500) で処理し、4°C、一晩インキュベートした。その後、二次抗体:抗ニワトリ Alexa405 抗体で処理し、室温、2 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、50% Glycerol を含む PBS 溶液で封入し、LSM700 ZEISS 共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。

## 9) マイクロパターンニングアッセイ

### ・PDMS スタンプの作製

六角形状のマイクロパターン (幅:14 $\mu\text{m}$ , 高さ:5.5 $\mu\text{m}$ )を、リソグラフィー技術を用いてエポキシフォトレジスト (SU-8、MicroChem)上に作製した。次に、マイクロパターン加工が凹状に施された基盤上に 10% バリアコート(信越化学工業)を含むトルエン溶液をのせ、スピナー (MIKASA)で 2000 rpm、10 秒、遠心することで、基盤上に薄いコーティングを施した。次に、10ml KE-103 (信越化学工業)、1ml CAT-103 (信越化学工業)、0.1% FZ-77 を混合し、デシケーター内で 20 分間、脱気処理を行った。その後、四角形状のシリコンの枠を基板上に載せ、シリコン溶液を流し込み、デシケーター内で 20 分間、脱気処理した。60°C、1 時間インキュベートし、枠内のシリコン溶液を固めることで、dimethylpolysiloxane (PDMS)に六角形状のマイクロパターンを施した。

### ・ラミネンのマイクロパターンニングと細胞培養

1M スクロース、0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA-conjugated Texas Red もしくは BSA-conjugated Alexa488、ラミネン (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む PBS 溶液を、用意した PDMS 上に載せ、

デシケーター内で脱気処理を行い、ラミニンを含む PBS 溶液を凹状の溝中に流し込んだ。その後、スピンドーターを用いて、3000 rpm、15 秒間遠心し、余分なラミニンを含む PBS 溶液を除去した。続いて、PDMS を、ポリリジンコートしたカバーガラス上に載せ、37°C、一晩、インキュベートした。その後、PDMS をカバーガラスから剥がし、PBS で 3 回洗浄した。

Control miRNA、Shootin1a miRNA、Cortactin miRNA、L1-CAM miRNA 発現ベクターを海馬神経細胞へそれぞれ遺伝子導入し、10% FBS、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地中で、37°C、24 時間、浮遊培養した。その後、回収し、10% FBS を含む Neurobasal 培地中で 37°C、3 時間培養した。続いて、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地を用いて、ラミニンマイクロパターンがコーティングされたカバーガラス上で 37°C、3 日間、培養した。Blebbistatin 処理する場合は、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M Blebbistatin を細胞培養開始と同時に添加した。Cytochalasin D 処理する場合は、1 $\mu$ M Cytochalasin D を細胞培養開始と同時に添加した。

その後、ホルマリン固定し、一次抗体:ラビット抗 GFP 抗体 (1:500) で 4°C、一晩処理した。その後、二次抗体抗:抗ラビット Alexa488 標識抗体 (1:1000)を用いて、室温、1 時間処理し、50% Glycerol を含む PBS 溶液を用いて、封入した。観察は、蛍光顕微鏡 (Axio plan2, Zeiss)を用いて行った。なお、軸索長の解析には ImageJ を用いた。

#### ・ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスにおける Cortactin と Shootin1a 相互作用の機能解析

Myc-NES-GST、Myc-NES-shootin1a (261-377)をエレクトロポレーション法により海馬神経細胞に遺伝子導入し、ラミニンマイクロパターンコーティングされたカバーガラス上に、 $2 \times 10^4$  個の細胞密度で撒き、37°C、5 日間培養した。その後、3.7%ホルムアルデヒド溶液で細胞を固定し、ラビット抗 myc 抗体 (1:1000)、Alexa488 標識抗ラビット抗体 (1:1000)を用いて染色し、蛍光顕微鏡 (Axio plan2, Zeiss)により、観察を行った。

#### ・ラミニン/ポリリジン境界における成長円錐のガイダンス制御のイメージングと $\Delta$ T273 L1-CAM 発現の効果

海馬神経細胞に L1-CAM RNAi#1 と L1-CAM WT EGFP refractory#1、もしくは  $\Delta$ T273 L1-CAM EGFP refractory#1 を共にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入し、10% FBS、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地中で、37°C、20 時間培養した。



その後、遺伝子導入した細胞を回収し、ラミネンマイクロパターンコーティングしたガラス直径 24mm のガラスボトムディッシュ上に神経細胞を  $1.5 \times 10^5$  個ずつ撒き、3 時間、37°C でインキュベートした。続いて、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地へ置換し、37°C、24 時間培養を行った。2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む L-15 培地へ交換後、IX-81 を用いて 37°C、撮影間隔 20 分間の条件で、成長円錐の動きをタイムラプス観察した。

## 10) 牽引力顕微鏡

ガラス直径 27mm のガラスボトムディッシュ上に 0.1N NaOH を載せ、室温で 15 分間処理した。その後、3-aminopropyl-trimethoxysilane (Sigma) を加え、室温で更に 15 分間処理した。インキュベート後、MQ 水で 3 回洗浄し、0.5% glutaraldehyde を含む PBS をガラスボトムディッシュ上に載せ、室温で 30 分間インキュベートした。MQ 水で、3 回洗浄し、乾燥させ、ゲル調製に使用した。

続いて、200nm 蛍光ナノビーズをアクリルアミドゲルと混合し、用意したガラスボトムディッシュ上に 200 $\mu$ l 載せ、カバーガラスで封入した。その後、室温で 2 時間静置させた後、カバーガラスを外し、クロスリンカー-sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate) (Sulfo-SANPAH, Thermo) をのせ、5 分間、UV 照射し活性化させた。PBS で 3 回洗浄後、100 $\mu$ g/ml ポリリジンをゲル上にのせ、37°C、一晩、インキュベートした。PBS で 3 回洗浄し、ラミネン (25 $\mu$ g/ml) をのせ、37°C、一晩、インキュベートした。その後、PBS で 3 回洗浄し、Neurobasal 培地をのせ、37°C、1 時間インキュベートした。ポリリジンのみでコーティングする場合は、100 $\mu$ g/ml ポリリジンをゲル上にのせ、37°C、一晩、インキュベートした。その後、PBS で 3 回洗浄し、Neurobasal 培地をのせ、37°C、1 時間インキュベートした。その後、コーティングした各ゲル基質上に、EGFP を遺伝子導入した海馬神経細胞を培養し、成長円錐直下の蛍光ナノビーズの動きを Axio Observer Z1 (C-Apochromat 63 $\times$ /1.20 W Korr M27、LSM 710 scan module、ZEN2009、Carl Zeiss) 用いて、5 秒間隔でタイムラプス観察した。また、牽引力の発生における  $\Delta$ T273 L1-CAM の影響を解析する場合は、L1-CAM RNAi#1 と  $\Delta$ T273 L1-CAM EGFP refractory#1 をエレクトロポレーション法により海馬神経細胞に共に遺伝子導入後、37°C、20 時間浮遊培養した。続いて、浮遊培養した細胞をゲル上に撒き直し、同様の条件で観察を行った。なお、ビーズの初期位置を撮影するため、1% SDS 処理により、細胞を剥がし、本来の位置のビーズを撮影した。牽引力の定量には、Matlab による数理解析システムを用いて解析を行った。

### 11) mRFP-actin、EGFP-shootin1a のイメージング

海馬神経細胞に mRFP-actin、EGFP-shootin1a を、Nucleofector を用いたエレクトロポレーション法により、遺伝子導入した。その後、ポリリジン、ラミニンでコーティングしたガラス直径 14mm のガラスボトムディッシュに、細胞を撒き、37°C、1 日培養した。続いて、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む 70% L-15 培地 (Gibco) に交換し、37°C で培養を行った。CMOS (Complementary Metal-Oxide Semiconductor) カメラを装備した蛍光顕微鏡 (ZEISS, AX10, plan-apochromat 100×/1.46 oil) を用いて、5 秒間隔で mRFP-actin、EGFP-shootin1a の逆行性移動をタイムラプス観察した。

### 12) ポリリジン及びラミニン各基質上における L1-CAM wild type halotag と EGFP-actin のイメージング

pFC14K L1-CAM wild type halotag を海馬神経細胞にエレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入し、ガラス直径 14mm のガラスボトムディッシュ (Matsunami) 上で、37°C、一晩培養した。L1-CAM と同時に actin を観察する場合は、pFC14K L1-CAM wild type halotag と pEGFP-actin を共に遺伝子導入した。Tetramethyl rhodamine (TMR) ligand (Promega) を培養培地で 1500 倍希釈し、1 時間インキュベートした。次に、PBS で 3 回洗浄後、2% B-27 supplement、1mM Glutamine を含む Neurobasal 培地で 30 分間インキュベートし、ディッシュ上に非特異的に結合した TMR リガンドを除去した。その後、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む 70% L-15 培地に培地交換した。EM-CCD カメラ (Andor) を装備した全反射顕微鏡 (Olympus) を用いて、561nm レーザー (COHERENT) により、インターバル 5 秒間隔で成長円錐と基質の接着面における L1-CAM halotag の分子動態をタイムラプス観察した。L1-CAM と actin を同時に検出する場合は、488nm と 561nm レーザー (COHERENT) により、シグナルを検出し、同様の条件で観察を行った。

### 13) ラミニン/ポリリジン境界の同一の成長円錐における L1-CAM wild type halotag のイメージング

ラミニンのマイクロパターニング法に従い、六角形状のラミニン基質をガラス直径 27 $\mu$ m のガラスボトムディッシュ上にコーティングした。その後、pFC14K L1-CAM wild type を遺伝子導入した神経細胞を用意した基質上に培養し、全反射顕微鏡 (Olympus) を用いて、ラミニン/ポリリジン境界上に位置した成長円錐のフィロポディアにおける L1-CAM の分子動態を 5 秒間隔でタイムラプス観察した。なお、ラミニン領域は 488nm レーザー、L1-CAM wild type halotag は 561nm レーザーを用いて励起した。

#### 14) $\Delta T273$ L1-CAM 発現時における EGFP-shootin1a の逆行性移動動態の解析

L1-CAM RNAi#1、 $\Delta T273$  L1-CAM halotag refractory#1、EGFP-shootin1a をエレクタロポレーション法を用いて海馬神経細胞に遺伝子導入し、10% FBS、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地中で、37°C、20 時間培養した。その後、遺伝子導入した細胞を回収し、ラミネンコーティングした 14mm ガラスボトムディッシュ上に神経細胞を  $8 \times 10^4$  個ずつ撒き、3 時間、37°C でインキュベートした。続いて、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地へ置換し、37°C、24 時間培養を行った。TMR ligand 処理後、CMOS カメラを装備した蛍光顕微鏡 (ZEISS, AX10, plan-apochromat 100 $\times$ /1.46 oil) を用いて、5 秒間隔で EGFP-shootin1a の逆行性移動をタイムラプス観察した。

#### 15) $\Delta T273$ L1-CAM halotag の逆行性移動動態の解析

海馬神経細胞  $1 \times 10^6$  個に、L1-CAM miRNA #1 発現ベクターと pFC14K L1-CAM wild type refractory #1 もしくは、pFC14K- $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 を遺伝子導入し、10% FBS、2% B-27 supplement、1mM Glutamine、1% Penicillin Streptomycin Mixed Solution を含む Neurobasal 培地中で、37°C、24 時間、浮遊培養を行った。その後、培養液を回収し、3000rpm、3 分間、遠心分離した。上清を除き、Solution A+ を 2ml 加え、タッピングにより、溶液を懸濁した。37°C、20 分間インキュベート後、ピペッティングにより、細胞塊を乖離させた。4°C、3000 rpm、3min 遠心分離後、PBS を加え洗浄し、再度同様の条件で、遠心した。10% FBS を含む Neurobasal 培地を用いて、ラミネンコートしたガラスボトムディッシュ上に細胞を撒いた。37°C、3 時間インキュベート後、2% B-27 Supplement、1% Glutamin、1% Penicilin streptomycine を含む Neurobasal 培地中で、37°C、24 時間培養した。その後、他の L1-CAM halotag イメージングと同様の方法、条件で、イメージングを行った。

#### 16) 軸索形成の数理モデルを用いた数理解析

我々の研究室では、神経突起長変化 (1) と成長円錐における Shootin1a の濃度変化 (2) を示す二つの微分方程式から構成される軸索形成の定量的な数理モデルを構築している (Toriyama et al., 2010)。

$$\frac{dL}{dt} = \delta k_{\text{on}} M - \delta k_{\text{off}} \exp[-\kappa f_s(C) + \kappa f_l(L)] \quad (1)$$

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{AD}{VL}(C - C_0) + w(t) \quad (2)$$

Shootin1a の生み出す牽引力の効果は、 $\kappa f_s(C)$  という Hill 関数 (3) として記述されている。

$$\kappa f_s(C) = \frac{\alpha_s C^h}{K_s^h + C^h} \quad (3)$$

本研究において、牽引力顕微鏡を用いて、ポリリジン、ラミニン上の成長円錐の生み出す牽引力を定量した。そこで、牽引力顕微鏡により定量した牽引力の値から、ポリリジン、ラミニン上の成長円錐における Shootin1a の生み出す牽引力の効果の最大値を制御するパラメーター  $\alpha_s$  を推定した。推定した  $\alpha_s$  値を用いて、ラミニン上の成長円錐における牽引力の増強が軸索形成へ及ぼす影響を数理的に検証した。

ラミニン上の成長円錐の生み出す牽引力は、ポリリジン上のものと比較して 3.9047 倍であった。また、本来の  $\alpha_s$  値 (5.1003) は、ラミニン上において推定された値である (Toriyama et al., 2010)。そこで、本来の  $\alpha_s$  値 (5.1003) を 3.9047 で割ることで、ポリリジン上の  $\alpha_s$  値 (1.3061) を推定した。次に、神経細胞の突起数を 4 本に設定し、ポリリジン、ラミニン上にそれぞれ 2 本の突起を配置した (図 9A)。コントロールとして、ポリリジン、ラミニン上の全ての成長円錐において、ポリリジン上で推定した  $\alpha_s$  値 (1.3061) を与え、シミュレーションを行った (図 9A)。次に、ラミニン上の成長円錐における Shootin1a の生み出す牽引力の増強が軸索形成へ及ぼす影響を解析した。方法として、ポリリジンとラミニン上の成長円錐において、それぞれ、ポリリジン上の  $\alpha_s$  値 (1.3061)、ラミニン上の  $\alpha_s$  値 (5.1003) を用いて牽引力に差異を与え、ラミニン、ポリリジンのどちらの領域に軸索を形成するかシミュレーションを行った (図 9B)。なお、表 5、6、7 に関連する定数、関数、変数のリストを示す (Toriyama et al., 2010)。

**Table 5. Constant parameter in the mathematical model**

Parameter	Unit	Meaning
$\alpha_s$	-	Maximum effect of relative shootin1 concentration in the growth cone.
$K_s$	Relative conc.	Concentration of shootin1 at which the traction force becomes half-maximum.
$h$	-	Hill coefficient.
$\alpha_l$	-	Maximum effect of neurite length on the neurite tension.
$K_l$	$\mu\text{m}$	Neurite length at which the neurite tension becomes half-maximum.
$L_0$	$\mu\text{m}$	Initial neurite length at which true strain is evaluated.
$\delta k_{on}$	$\mu\text{m}/\text{min}$ (relative conc.)	Elongation velocity per unit concentration of material molecules ( $M$ ) as the product of the size of the material molecules ( $\delta$ ) and the polymerization rate ( $k_{on}$ ).
$\delta k_{off}$	$\mu\text{m}/\text{min}$	Retraction velocity as the product of the size of the material molecules ( $\delta$ ) and the depolymerization rate ( $k_{off}$ ).

**Table 6. Definitions of functions**

Formula	Meaning
$w(t) = \frac{V_w}{V} W_{avg} \sum_i a_j g(t - t_j)$	Active shootin1 transport defined as the sum of temporally discrete events for each neurite.
$\kappa f_l(L_i) = \frac{\alpha_l \ln(\frac{L_i}{L_0})}{\ln(\frac{K_s}{L_0}) + \ln(\frac{L_i}{L_0})}$	Effect of neurite length on neurite tension ( $f_l(L_i)$ ) with true strain, $\ln(L_i/L_0)$ .

**Table 7. Variables**

Variable	Unit	Meaning
$C_i, C_o$	Relative conc.	Relative shootin1 concentrations in the $i$ -th growth cone and cell body.
$a_j$	-	Amplitude of shootin1 concentration of the $j$ -th wave, which is random variable chosen from gamma distribution.
$t, t_j$	min	Simulation time and the $j$ -th occurrence time of shootin1 transport. The interval between the transports is random variable chosen from gamma distribution.
$L_i$	$\mu\text{m}$	Length of the $i$ -th neurite.
$M$	Relative conc.	Relative concentration of free material molecules required for neurite shaft construction.

## <結果>

### 1) ラミニン上における軸索伸長機構

成長円錐の辺縁部において、アクチン線維は成長円錐の中心に向かって逆行性に移動する (Schaefer et al., 2008)。アクチン線維の逆行性移動は、細胞外環境を感知するセンサーとして働き、軸索伸長、ガイダンスに関与すると考えられている (Nichol IV et al., 2016)。成長円錐の先端領域において、アクチンモノマーは、アクチン線維のプラス端に重合し、マイナス端で脱重合する。プラス端でアクチンモノマーが重合すると、アクチン線維が細胞膜により押し返され、アクチン線維の逆行性移動が生じる (Michison. T et al, 1988 ; Pollard et al, 2003 ; Clainche et al., 2008)。更に、ミオシン II はマイナス端側でアクチン線維を牽引することで、アクチン線維の逆行性移動を促進する (Mederios et al., 2006 ; Craig et al., 2012)。L1-CAM は Shootin1a と Cortactin を介して逆行性移動を示すアクチン線維と連結する (Shimada et al., 2008 ; Kubo et al., 2015)。更に、L1-CAM は細胞外でラミニンと相互作用することで、成長円錐が移動するための牽引力を生み出し、軸索伸長を促進すると考えられる (図 1)。

### 2) Shootin1a はラミニンに誘導される軸索形成に必要である

ラミニンは神経細胞の軸索形成の方向性を制御することが知られている (Esch et al, 1999)。成長円錐の L1-CAM は細胞外でラミニンと結合する。Shootin1a は L1-CAM から構成される牽引力制御機構の構成分子の一つであり (図 1)、細胞内において L1-CAM と相互作用し、軸索伸長を促進する (Shimada et al., 2008)。よって、Shootin1a がラミニンによる軸索形成の方向性制御に関与している可能性がある。そこで、この可能性を検証するため、海馬神経細胞において、Shootin1a miRNA により、Shootin1a を発現抑制した。この Shootin1a を発現抑制した神経細胞を、ラミニンとポリリジンが交互に並ぶ基質上に培養し、軸索形成の方向性が変化するか解析した。この際に、神経細胞のマイナープロセスの長さを定量し、軸索における軸索形成開始時の成長円錐の位置を予測した。そして、神経細胞の少なくとも一つの突起先端が、ラミニンもしくはポリリジン上に位置している神経細胞を選択した。また、Shootin1a を免疫染色し、Shootin1a miRNA によって Shootin1a の発現量が減少している細胞を解析に用いた。

まず、Control において、神経細胞の 85% は、ラミニン上に軸索を形成した (図 2A, D, n = 92)。次に、Shootin1a miRNA #1 および #2 により Shootin1a の発現を抑制したところ、ラミニン上に軸索を形成した神経細胞の割合はそれぞれ 47%、48% となり、ラミニン上における軸索形成が有意に抑制された (図 2B, C, D #1, n

= 93; #2, n = 92)。以上の結果から、Shootin1a はラミニンに誘導される軸索形成の方向性の制御に必要であることが示唆された。

続いて、共同研究者の勝野弘子博士研究員に提供して頂いた実験データを参考資料 (◆)として、紹介する。

#### ◆ Shootin1a, Cortactin および L1-CAM はラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに関与する

脳内において軸索は前進するだけでなく、移動方向を変えながら、標的組織へ投射する (Lowery et al, 2009 ; Sun et al., 2013)。軸索が方向転換する際に、成長円錐は前進するのか、曲がるのか選択を迫られる。このような、脳内における軸索ガイダンスの環境を模倣し、成長円錐に多くの移動方向の選択の機会を提示するために、ラミニンを六角形状にマイクロパターン化した基質を作製した (参考資料 1A)。次に、ラミニンにより軸索がガイダンスされるか解析するために、用意した六角形状のラミニン基質上にラット培養海馬神経細胞を培養し、軸索ガイダンス過程をライブイメージング法を用いて観察した。その結果、軸索先端の成長円錐が周囲を探索し、ラミニン上を特異的に伸長する様子が観察された (参考資料 1A)。次に、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに Shootin1a, Cortactin, L1-CAM が関与するか解析するため、Shootin1a, Cortactin, L1-CAM miRNA により、各分子を発現抑制し、ラミニンによる軸索ガイダンスが阻害されるかを解析した。まず、Shootin1a を Shootin1a miRNA により発現抑制したところ、軸索は、ラミニン上から外れ、ポリリジン上へ伸長した。ラミニン上に位置した軸索の長さの割合を定量したところ、Control と比較して、Shootin1a miRNA により、その長さの割合は、有意に減少を示した (参考資料 1B)。更に、Cortactin および L1-CAM miRNA により各分子を発現抑制したところ、ラミニン上に位置した軸索の長さの割合は有意に減少を示した (参考資料 1C, D)。このことから、Shootin1a, Cortactin, L1-CAM はラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに必要であることが示唆された。

#### ◆ ミオシン II およびアクチン重合の阻害はラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスを抑制する

アクチン線維を細胞外基質ラミニンへ連結する Shootin1a, Cortactin, L1-CAM がラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに必要であることが示唆された (参考資料 1A-D)。よって、これらの分子から構成される牽引力制御機構が、アクチン線維の逆行性移動と相互作用することで、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに関与していると考えられる。しかしながら、アクチン線維の逆行性移動がラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスにおいて重要な役割を果たしているかは明らかではない。

そこで、アクチン線維の逆行性移動がラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに関与しているか解析するために、**Blebbistatin** 及び **Cytochalasin D** を用いてアクチン線維の逆行性移動を阻害し、ラミニンによる軸索ガイダンスが抑制されるかを解析した。ミオシン II は、アクチン線維のマイナス端側で活性化することで、アクチン線維の逆行性移動を駆動する。**Blebbistatin** はミオシン II の ATPase 活性を阻害することで、ミオシン II の持つモーター活性を抑制する。六角形状のラミニンマイクロパターン上で神経細胞を培養し、50、100 $\mu$ M **Blebbistatin** を用いて処理し、3日間培養を行った。その結果、コントロールでは、軸索長の91%がラミニン上に位置していた。一方で、**Blebbistatin** 処理を行ったところ、50 $\mu$ M **Blebbistatin** において軸索長の58%、100 $\mu$ M **Blebbistatin** においては軸索長の60%がラミニン上に位置しており、コントロールと比較してラミニン上の軸索の長さの割合は有意に減少を示した (参考資料 2A, B)。

**Cytochalasin D** は、アクチン線維のプラス端に結合し、単量体アクチンのプラス端への重合を阻害することで、アクチン線維の逆行性移動を抑制する (Forscher et al, 1988 ; Kubo et al., 2015)。六角形状のラミニン基質上で神経細胞を培養し、1 $\mu$ M **Cytochalasin D** を用いて処理し、3日間培養を行った。その結果、コントロール (DMSO 処理) では、軸索長の73%がラミニン上に位置していた。一方で、**Cytochalasin D** 処理したところ、軸索長の49%がラミニン上に位置しており、コントロールと比較して、24%の減少を示した (参考資料 3A, B)。以上の結果から、アクチン線維の逆行性移動は、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに関与することが示唆された。

### 3) **Shootin1a DN** (ドミナントネガティブ)変異体により **Shootin1a** を介したクラッチ連結を阻害すると、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスが抑制される

**Shootin1a**、**Cortactin RNAi** によって、**Shootin1a**、**Cortactin** がラミニンによる軸索ガイダンスに関与することが示唆された。しかしながら、**RNAi** により、**Shootin1a** と **Cortactin** のアクチン線維とラミニン間の連結以外の機能が阻害されたことで、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスが抑制された可能性がある。そこで、**Shootin1a** と **Cortactin** のクラッチ機能がラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに関与しているかを調べるため、**Shootin1a** と **Cortactin** 間の連結を切る **Shootin1a DN** 変異体 (261-377) (Kubo et al., 2015) を用いて、ラミニンを介した軸索ガイダンスに対する効果を解析した。

コントロールとして **Myc-NES-GST** を発現させた神経細胞では、ラミニン上の軸索の長さの割合は70%であった。一方で、**Myc-NES-Shootin1a DN** (261-377) を発現させた神経細胞では、その割合は51%であり、ラミニンによる軸索ガイダ



ンスが有意に抑制された (図 3A, B)。以上の結果から、Shootin1a を介したクラッチ連結がラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスに関与することが示唆された。

ここまでの結果をまとめると、ラミニンによる走触性制御を介した軸索形成及び軸索ガイダンスに Shootin1a、Cortactin および L1-CAM を介した牽引力制御機構 (図 1) が関与することが示唆された。

#### 4) ラミニンによって成長円錐が生み出す牽引力は強められる

Shootin1a、Cortactin および L1-CAM がラミニンに誘導される軸索形成に必要であることが示された (図 2, 図 3, 参考資料 1)。しかしながら、ラミニンによる走触性制御を介した軸索形成及びガイダンスの分子メカニクスは明らかではない。Shootin1a は細胞内でアクチン線維と L1-CAM 間を連結し、牽引力を生み出す。Shootin1a と相互作用する L1-CAM は、細胞外でラミニンと結合するため、ラミニン上で成長円錐が生み出す牽引力が強められることで、軸索がラミニン方向に伸長する可能性が考えられる。そこで、ラミニン上で成長円錐が生み出す牽引力が変化するかどうかが解析するため、牽引力顕微鏡 (Chan et al, 2008 ; Toriyama et al., 2013 ; Kubo et al., 2015) を用いて、ポリリジン、ラミニン上の成長円錐における牽引力を定量した。その結果、ポリリジン上では成長円錐の生み出す牽引力は、 $2.1 \pm 0.4 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  (mean  $\pm$  SE, n = 11) を示した (図 4A, D)。一方で、ラミニン上では成長円錐の生み出す牽引力は、 $8.2 \pm 2.2 \text{ pN}/\mu\text{m}^2$  (mean  $\pm$  SE, n = 14) を示した (図 4B, D)。また、牽引力の合力の方向性を算出したところ、牽引力は、ポリリジン、ラミニン上の成長円錐において、軸索伸長と反対方向に生じていた (図 4C)。以上のことから、ラミニンは、成長円錐の基質上に生み出す牽引力を強めることで、軸索に推進力を伝え、軸索形成及び軸索ガイダンスを制御していることが示唆された。

#### 5) ラミニン上の成長円錐において、mRFP-actin、EGFP-shootin1a の逆行性移動速度が減少する

ラミニン上で成長円錐が生み出す牽引力が強められることが示された (図 4A-D)。しかし、ラミニンがどのように成長円錐に作用して、牽引力を強めるのか、そのメカニズムは明らかではない。ラミニンは、Cdc42、Rac1 GTPase を活性化し、アクチン重合を促進するという報告がある (Myers et al., 2012)。その為、ラミニン上の成長円錐において、アクチン重合が促進されることで、アクチン線維の逆行性移動速度の上昇を介して、成長円錐の運動能が活性化し、牽引力が強められている可能性が考えられる。

そこで、ラミニン上においてアクチン線維の逆行性移動速度が変化するかどうかが解析するため、mRFP-actin を発現させた神経細胞を、ポリリジン、ラミニン各基質上に培養し、蛍光顕微鏡を用いて成長円錐における mRFP-actin の逆行性移動速度を解析した。ポリリジン上の成長円錐において mRFP-actin の逆行性移動速度は  $4.7 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 301) であった (図 5A、B)。一方、ラミニン上の成長円錐では、mRFP-actin の逆行性移動速度は  $2.6 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 306) であり、驚いたことに、ポリリジン上と比べると、その速度は有意に遅かった (図 5A、B)。

続いて、ポリリジン、ラミニン各基質上の成長円錐における EGFP-shootin1a の逆行性移動速度を解析した。Shootin1a は Cortactin を介して、アクチン線維の逆行性移動と相互作用する (Kubo et al., 2015)。ポリリジン上の成長円錐において、EGFP-shootin1a の逆行性移動速度は  $4.3 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 419) であった (図 5C、D)。一方、ラミニン上の成長円錐では、EGFP-shootin1a の逆行性移動速度は  $1.33 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 386) であり、ポリリジンと比べると有意に遅かった (図 5C、D)。このことから、ポリリジン上と比べて、ラミニン上の成長円錐において、アクチン線維、Shootin1a の逆行性移動速度が減少することがわかった。よって、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスにおいて、アクチン重合の促進が主要なメカニズムとして働いているのではなく、他のメカニズムの関与が考えられた。

## 6) L1-CAM は逆行性移動の過程において、ポリリジンと比べて、ラミニン上でグリップを強める

ラミニンによる牽引力の増強において、アクチン重合の促進は主要なメカニズムではないとすると、どのようなメカニズムが働いているのであろうか?そこで、このメカニズムを明らかにするために、ポリリジン、ラミニン両基質上においてラミニンと直接相互作用すると考えられる L1-CAM の分子動態を、Halotag でラベルした L1-CAM と全反射顕微鏡を用いて観察した。

すると、L1-CAM halotag は特徴的な分子動態を示すことが分かった。L1-CAM halotag は、逆行性移動の過程で停止と移動を繰り返している様子が観察された (図 6A)。また、L1-CAM の分子イメージングは、タイムラプス撮影を行っているが、2つのフレームの間隔を 1 フェーズとした。L1-CAM halotag が逆行性に移動しているフェーズは、L1-CAM halotag がラミニン上を滑っている状態と考え、スリップフェーズとした。一方で、L1-CAM halotag が停止しているフェーズは、L1-CAM halotag がラミニン上に固定されている状態と考え、グリップフェーズとした。L1-CAM halotag のスリップとグリップフェーズの割合を、ポリリジン、ラミニン各基質上のフィロポディアにおいて解析した。その結果、ポリリジン上

のフィロポディアでは、L1-CAM halotag 分子のスリップフェーズの割合は 78% であり、一方で、グリップフェーズの割合は 22% であった (n = 1076 フェーズ)。ラミニン上のフィロポディアにおいては、L1-CAM halotag のスリップフェーズの割合は 49% であり、一方で、グリップフェーズの割合は 51% であった (n = 1531 フェーズ)。ポリリジン上の成長円錐と比べて、ラミニン上の成長円錐では、L1-CAM halotag がスリップするフェーズの割合が減少し、グリップするフェーズの割合が有意に増加した (図 6B)。次に、グリップフェーズとスリップフェーズの持続時間を比較したところ、ラミニン上においてグリップフェーズの持続時間がポリリジン上と比べて長い傾向が見られたが、有意差は無かった (図 6C)。続いて、スリップとグリップの両フェーズを含めた L1-CAM halotag の逆行性移動速度を算出した。ポリリジン上のフィロポディアにおいて、この L1-CAM halotag の逆行性移動速度は、 $3.4 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 235) であった。一方で、ラミニン上のフィロポディアにおいて、L1-CAM halotag の逆行性移動速度は、 $0.9 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 268) であった (図 6D)。ポリリジン上と比べて、ラミニン上の成長円錐において、その速度は有意に遅かった。このことから、L1-CAM は逆行性に移動している間に、ポリリジンよりも、ラミニン上でグリップを強めることが示唆された。

Shootin1a は成長円錐において L1-CAM と相互作用し、突起伸長を促進する (Shimada et al., 2008)。ラミニン上の成長円錐において、アクチン線維、Shootin1a の逆行性移動速度はポリリジン上のものと比べて、遅かった。これは、アクチン線維、Shootin1a が相互作用する L1-CAM が、ラミニン上に固定されることで生じたと考えられる。よって、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスにおいて L1-CAM とラミニン間の連結が重要な役割を担っていることが示唆された。

## 7) 同一の成長円錐において、L1-CAM はポリリジンと比べてラミニン上でグリップを強める

続いて、同一の成長円錐において、ポリリジン、ラミニン各基質によって、L1-CAM の逆行性移動の動態が変化するか解析するため、ラミニンとポリリジンの境界に位置した成長円錐における L1-CAM halotag の逆行性移動の動態を解析した。ポリリジン上のフィロポディアにおいて、L1-CAM halotag のスリップフェーズの割合は 78% であり、一方、グリップフェーズの割合は 22% であった (図 7B、n = 741 フェーズ)。ラミニン上のフィロポディアにおいては、L1-CAM halotag のスリップフェーズの割合は 47% であり、グリップフェーズの割合は 53% であった (図 7B、n = 900 フェーズ)。ポリリジン上と比べて、ラミニン上のフィロポディアにおいて、L1-CAM のスリップフェーズの割合が小さく、グリップフェー

ズの割合が有意に大きかった。次に、グリップとスリップの両フェーズを含めた L1-CAM 逆行性移動速度を算出した。ポリリジン上のフィロポディアでは、L1-CAM 逆行性移動速度は、 $3 \pm 0.38 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 159)であり、ラミニン上のフィロポディアでは、 $1.1 \pm 0.19 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 175)であった (図 7C)。ポリリジン上のフィロポディアにおける L1-CAM 逆行性移動速度と比較して、ラミニン上のフィロポディアにおいて、L1-CAM 逆行性移動速度は有意に遅かった。このことから、同一成長円錐においても、L1-CAM は、ポリリジンと比べて、ラミニン上でグリップを強めることが示唆された。

#### 8) 牽引力発生時に生じる分子間の滑りは、主に L1-CAM と細胞外基質ラミニン間で生じる

細胞接着分子インテグリンは、成長円錐においてラミニンと相互作用し、移動するための牽引力を生み出すことが知られている (Myers et al, 2011)。インテグリンは、ラミニン上において強く固定され動かないが、アクチン線維は逆行性に移動することから、細胞内において、アクチン線維とインテグリンの間に滑りが生じていることが示唆されている (Nichol et al, 2016)。

L1-CAM から構成される牽引力制御機構においては、アクチン線維からラミニン基質間のどの分子間で滑りが生じているか、実体は明らかではない。そこで、L1-CAM を介した牽引力制御機構において、アクチン線維からラミニン基質間のどの分子間で滑りが生じているか解析するために、ポリリジンとラミニン上の成長円錐において、L1-CAM halotag と EGFP-actin を同時励起し TIRF を用いて両分子の逆行性移動を観察した。その結果、ポリリジン上において、L1-CAM halotag の逆行性移動速度は  $4.2 \pm 0.31 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 58)、EGFP-actin の逆行性移動速度は  $4.5 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 51)であり、ほぼ同じ速度で移動していた (図 8A, C)。また、ラミニン上においても同様に、L1-CAM halotag の逆行性移動速度は  $1.6 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 121)、EGFP-actin の逆行性移動速度は  $2.2 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 88)であり、ほぼ同じ速度であった (図 8B, C)。更に、ポリリジン上の L1-CAM halotag、EGFP-actin の逆行性移動速度とラミニン上の L1-CAM halotag、EGFP-actin の逆行性移動速度を比較したところ、ラミニン上において L1-CAM halotag、EGFP-actin の逆行性移動速度は有意に遅かった (図 8C)。以上のことから、L1-CAM から構成される牽引力制御機構における、アクチン線維からラミニン基質間で生じると考えられる分子間の滑りは、主に L1-CAM とラミニン間で生じることが示唆された。

## 9) Shootin1a を介した牽引力制御システムは、ラミニンに誘導される軸索形成に 関与する

本研究において、ポリリジン上と比較して、ラミニン上の成長円錐では、成長円錐の生み出す牽引力が強められていることが示唆された (図 4)。そこで、ラミニン上の成長円錐における Shootin1a の生み出す牽引力の増強が軸索形成に関与するか解析するために、本研究室において構築された軸索形成の数理モデル (Toriyama et al., 2010) を用いて、シミュレーションを行った。シミュレーションの為に、牽引力顕微鏡で定量したラミニン、ポリリジン上の成長円錐の生み出す牽引力の値 (図 4D) を用いて、Shootin1a の生み出す牽引力の効果の最大値を制御するパラメーター  $\alpha_s$  を推定した。

まず、コントロールとして、ラミニン、ポリリジン上の成長円錐において、同じ牽引力を示すようにシミュレーションを行った。すると、ラミニン、ポリリジン上に軸索を形成した神経細胞はほぼ同じ割合だった (図 9C,  $n = 150$ )。一方、定量データに基づいて、ポリリジン上の成長円錐と比べてラミニン上の成長円錐において Shootin1a を介して生み出される牽引力を強めたところ、98%の神経細胞がラミニン方向へ有意に軸索を形成した (図 9D,  $n = 150$ )。このことから、Shootin1a を介した牽引力制御システムは、ラミニンに誘導される軸索形成に関与することが示唆された。

## 10) ヒト L1 症候群患者で新規に同定された $\Delta T273$ L1-CAM 変異により、野生型 L1-CAM と比べて、 $\Delta T273$ L1-CAM とラミニン間の相互作用が減少する (馬 場健太郎博士との共同実験)

これまでの結果から、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスにおいて、L1-CAM とラミニン間の連結が重要な役割を担うことが示唆された (図 6,7 参考資料 1)。一方で、L1-CAM における遺伝子変異は、L1 症候群と呼ばれる軸索ガイダンス異常を伴う神経疾患を引き起こす。L1 症候群を発症したヒト 21 週令胎児において、L1-CAM の 273 番目のスレオニンの欠損 ( $\Delta T273$ ) が報告された (Yamasaki et al, 2011 ; itoh et al, 2015) (図 10A)。ヒト L1 症候群患者では、軸索ガイダンス異常が観察されることから、野生型 L1-CAM と比較して、L1-CAM の  $\Delta T273$  変異により、 $\Delta T273$  L1-CAM とラミニン間の相互作用が減少している可能性が考えられる。

そこで、L1-CAM とラミニン間の結合量の変化を解析するために、L-CAM 細胞外ドメイン (L1-CAM-WT-ECD) もしくは  $\Delta T273$  L1-CAM 細胞外ドメイン ( $\Delta T273$  L1-CAM-ECD) を発現するベクターを作製し、HEK293T 細胞を用いて各分子を発現させた。発現させた各分子のタンパク質を回収後、精製し、ラミニンとの *in vitro* 結合解析を行った。その結果、L1-CAM-WT-ECD と比べて、 $\Delta T273$

L1-CAM-ECD とラミニン間の結合量は、調べた全てのラミニン濃度 (0, 10, 50, 100, 500 nM)において減少を示した (図 10B, C)。以上の結果から、L1-CAM の 273 番目のスレオニン(T)の欠失は、L1-CAM とラミニン間の相互作用を減少させることがわかった。なお、以前に報告があるように (Timpl et al., 1979)、ラミニンは 220 kDa と 440 kDa の二つのバンドから構成されていた (図 10B)。

#### 11) ヒト L1 症候群患者で新規に同定された $\Delta T273$ L1-CAM 変異体のラミニン上におけるグリップは低下する

野生型 L1-CAM と比較して  $\Delta T273$  L1-CAM とラミニン間の相互作用が減少を示した (図 10)。そのため、 $\Delta T273$  L1-CAM の逆行性移動の過程において、ラミニン上における  $\Delta T273$  L1-CAM のグリップ力が低下し、 $\Delta T273$  L1-CAM のグリップフェーズとスリップフェーズの割合及び逆行性移動速度が変化する可能性が考えられる。

そこで、ラミニン上における野生型 L1-CAM と  $\Delta T273$  L1-CAM の逆行性移動動態を比較するため、ラミニン上の成長円錐において、野生型 L1-CAM 及び  $\Delta T273$  L1-CAM 変異体の逆行性移動を観察した。L1-CAM の逆行性移動の観察に先立ち、L1-CAM wild type refractory #1 EGFP、 $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 EGFP を作成し、HEK293T 細胞を用いて、発現解析を行った。作製した各種 L1-CAM は、ウエスタンブロットにより、250kDa 付近に二本のバンドとして、検出された (図 11A)。更に、HEK293T 細胞における各種 L1-CAM の発現部位を解析したところ、細胞膜にその発現が観察された (図 11B, C)。

次に、全反射顕微鏡を用いて、ラミニン上の成長円錐における L1-CAM wild type refractory #1 halotag、 $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 halotag の計測を行い、各種 L1-CAM halotag のグリップとスリップフェーズの割合を解析した。なお、L1-CAM はホモフィリックに結合するため、内在性の L1-CAM が遺伝子導入した各種 L1-CAM の逆行性移動に影響を与える可能性が考えられた。そこで、L1-CAM wild type refractory #1 halotag もしくは  $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 halotag の遺伝子導入と同時に、L1-CAM miRNA#1 を導入し、内在性の L1-CAM の発現を抑制した。その結果、ラミニン上の成長円錐において、L1-CAM wild type refractory #1 halotag のスリップフェーズの割合は 43% であり、グリップフェーズの割合は 57% であった (図 12A, B n = 1641 フェーズ)。一方、ラミニン上における  $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 halotag のスリップフェーズの割合は 80% であり、グリップフェーズの割合は 20% であった (図 12A, B n = 890 フェーズ)。L1-CAM wild type refractory #1 halotag と比べて、 $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 halotag では、ラミニン上においてスリップフェーズの割合が大きく、グリップフェーズの割合が有意に小さかった。また、L1-CAM のグリップフェーズとスリップフェーズの持続

時間を解析したところ、ラミニン上において L1-CAM wild type refractory #1 halotag と比べて  $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 halotag のグリップフェーズの持続時間が有意に短かった (図 13)。更に、各種 L1-CAM 分子のスリップ、グリップ全てのフェーズを含めて逆行性移動速度を解析した。その結果、L1-CAM wild type refractory #1 halotag の逆行性移動速度は  $1.5 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 252) であった。一方、 $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 halotag の逆行性移動速度は、 $3.2 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE, n = 203) であり、L1-CAM wild type refractory #1 halotag の逆行性移動速度と比べて、有意に速かった (図 12C)。以上の結果から、L1-CAM の 273 番目のスレオニンの欠失により、ラミニン上の成長円錐において  $\Delta T273$  L1-CAM のグリップが低下することが示唆された。

## 12) $\Delta T273$ L1-CAM 変異により Shootin1a の逆行性移動速度は速まる

L1-CAM の 273 番目のスレオニンの欠失により、 $\Delta T273$  L1-CAM の逆行性移動速度が速まった (図 12C)。そのため  $\Delta T273$  L1-CAM の逆行性移動速度の上昇に伴い、Shootin1a の逆行性移動速度も速まる可能性がある。そこで、 $\Delta T273$  L1-CAM 発現時における Shootin1a の逆行性移動速度の変化を解析するため、ラミニン上の  $\Delta T273$  L1-CAM refractory#1 halotag を発現する神経細胞の成長円錐における EGFP-shootin1a の逆行性移動をライブイメージング法により解析した。

ラミニン上の L1-CAM wild type refractory#1 halotag を発現させた神経細胞における EGFP-shootin1a の逆行性移動速度は  $1.8 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE) であった。これは、ラミニン上における EGFP-shootin1a のみを発現させた神経細胞の EGFP-shootin1a の逆行性移動速度と近い速度であった (図 5D, 12D)。一方で、ラミニン上における  $\Delta T273$  L1-CAM refractory#1 halotag を発現させた神経細胞における EGFP-shootin1a の逆行性移動速度は、 $4.2 \pm 0.4 \mu\text{m}/\text{min}$  (mean  $\pm$  SE) であり、L1-CAM wild type refractory#1 halotag を発現させた場合と比べて、有意に速かった (図 12D)。また、ラミニン上における  $\Delta T273$  L1-CAM refractory#1 halotag を発現させた神経細胞における EGFP-shootin1a の逆行性移動速度は、ポリリジン上における EGFP-shootin1a の逆行性移動速度と近かった (図 5D, 12D)。以上の結果から、ラミニンによる走触性を介した軸索ガイダンスの抑制における  $\Delta T273$  L1-CAM の機能に、Shootin1a が関与することが示唆された。

## 13) $\Delta T273$ L1-CAM 変異によりラミニン上の成長円錐における牽引力は減少する

ラミニン上における  $\Delta T273$  L1-CAM の逆行性移動速度は、野生型 L1-CAM の逆行性移動速度と比較して速まっていた (図 12C)。更に、ポリリジン上と比較して、ラミニン上における  $\Delta T273$  L1-CAM のグリップフェーズの割合は小さく、

スリップフェーズの割合は大きかった (図 12B)。以上の結果から、ラミニン上の成長円錐直下で発生する牽引力は、 $\Delta T273$  L1-CAM 変異により減少を示す可能性がある。そこで、ラミニン上において、 $\Delta T273$  L1-CAM 変異による神経細胞の成長円錐における牽引力の変化を解析するために、ラミニン上の L1-CAM wild type refractory #1 EGFP もしくは  $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 EGFP を発現させた神経細胞の成長円錐において、牽引力を定量した。その結果、L1-CAM wild type refractory #1 EGFP を発現した成長円錐と比較して、 $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 EGFP を発現した成長円錐の生み出す牽引力は減少を示した (図 14 A)。以上の結果から、 $\Delta T273$  L1-CAM 変異により、成長円錐の生み出す牽引力は減少することが示唆された。

#### ◆ $\Delta T273$ L1-CAM 変異により、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスが抑制される

$\Delta T273$  L1-CAM 変異により、成長円錐の生み出す牽引力が低下を示した (図 14)。そのため、 $\Delta T273$  L1-CAM 変異は、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスを抑制する可能性が考えられた。そこで、 $\Delta T273$  L1-CAM 変異のラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスへの影響を、六角形状のラミニンマイクロパターン基質を用いて解析した。

その結果、L1-CAM wild type refractory #1 EGFP を発現させた神経細胞では、ラミニン上の軸索の長さの割合が 77% を示した (参考資料 4A, B)。一方で、 $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 EGFP を発現させた神経細胞では、その割合は 59% であり、ラミニン上の軸索の長さの割合は減少を示した (参考資料 4A, B)。以上のことから、 $\Delta T273$  L1-CAM 発現はラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスを抑制することが示唆された。

#### 14) $\Delta T273$ L1-CAM 変異により、ラミニン/ポリリジン境界におけるラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスが抑制される

六角形状のラミニンのマイクロパターン基質を用いた軸索ガイダンス解析 (参考資料 1-4, 図 3) では、細胞を固定しているため、成長円錐がラミニン/ポリリジン境界において、どの程度ラミニン依存的にガイダンス制御を受けているかは分からなかった。更に、ラミニン/ポリリジン境界において、 $\Delta T273$  L1-CAM 変異により、どれほどラミニンを介した軸索ガイダンスが抑制されるかは不明であった。そこで、ラミニン/ポリリジン境界におけるラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンス効果、及びその境界における  $\Delta T273$  L1-CAM 変異の軸索ガイダンスへの影響を解析するため、ラミニン/ポリリジン境界における野生型 L1-CAM もしくは  $\Delta T273$  L1-CAM を発現する神経細胞の成長円錐の挙動をラ



イブイメージング法により解析した。

まず、ラミニン側に位置する L1-CAM wild type refractory #1 EGFP を発現させた神経細胞の成長円錐では、77%の成長円錐がラミニン/ポリリジン境界において、ポリリジン側へ行かずにラミニン上を移動した (図 15A)。一方で、 $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 EGFP を発現させた神経細胞では、ラミニン/ポリリジン境界において、ラミニン上を移動した成長円錐の割合が 40%へ減少し、多くの成長円錐はポリリジン側へと移動した (図 15A)。続いて、ポリリジン側に位置する成長円錐のラミニン/ポリリジン境界における挙動を解析したところ、L1-CAM wild type refractory #1 EGFP と  $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 EGFP をそれぞれ発現させた場合において、殆どの成長円錐がラミニン上へ移動した (図 15B)。

以上のことから、 $\Delta T273$  L1-CAM 変異は、ラミニンを介した軸索ガイダンスを抑制することが示唆された。

## <考察>

### 1) ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスのメカニズムについて

ラミニンは、成長円錐に局在するインテグリンを介して、FAK を活性化し、Cdc42、Rac1 GTPase によるアクチン重合を促進することで軸索伸長を促進するという報告がある (Weston et al., 2000 ; Myers et al, 2012)。更に、ラミニンはミオシン II の活性化を促進する可能性が示唆されている (Turney et al, 2005)。ラミニンと相互作用する L1-CAM は、細胞内にシグナルを伝え Rac1 GTPase を活性化する (Maness et al, 2007)。成長円錐先端のアクチン線維のプラス端において、アクチンモノマーが重合すると、アクチン線維が細胞膜を強く押し出す。細胞膜の収縮する性質によって、細胞膜が押し出され伸長すると張力が高まり、アクチン線維は成長円錐の先端端と反対側へ押し戻され、アクチン線維の逆行性移動が生じる。アクチン重合が促進されると、細胞膜の張力が更に高まることで、アクチン線維が強く押し返され、アクチン線維の逆行性移動速度が速まると考えられる (図 16A) (Michison. T et al, 1988)。このことから、ラミニン上の成長円錐において、シグナル伝達を介したアクチン重合の促進により、アクチン線維の逆行性移動速度が上昇するというモデルが提唱された。しかしながら、ポリリジン上と比較して、ラミニン上の成長円錐において、アクチン線維の逆行性移動速度は、有意に遅かった (図 5A, B, 16C)。更に、ポリリジン上と比較して、ラミニン上の成長円錐において、アクチン線維と連結する L1-CAM の逆行性移動速度も、有意に遅かった (図 6A, D, 16C)。これらの結果から、ラミニンによる走触性制御において、ラミニンを介したアクチン重合の促進が主要なメカニズムとして働いているのではないと考えられる。

一方で、Netrin は Cdc42、Rac1 GTPase を介して Pak1 を活性化し、Shootin1a のリン酸化を促進する (Toriyama et al., 2013)。Shootin1a のリン酸化により、Shootin1a と Cortactin 間の結合が強まり、アクチン線維と L1-CAM 間の連結が強化される (Kubo et al., 2015)。ラミニンによって Cdc42、Rac1 GTPase が活性化されるという報告を考慮すると、シグナル伝達により Pak1 を介した Shootin1a のリン酸化が上昇し、リン酸化 Shootin1a を介したアクチン線維と L1-CAM の連結が強化されるというモデルも想定された (図 16B)。Shootin1a のリン酸化により、アクチン線維と L1-CAM 間の連結が強化されると、アクチン線維と L1-CAM 間で生じる滑りが減少し、L1-CAM がアクチン線維の逆行性移動と強く相互作用することで、L1-CAM の逆行性移動速度が速まると考えられる。一方で、L1-CAM との相互作用が増加したアクチン線維は、L1-CAM と基質間にかかる抵抗により、その逆行性移動速度が減少すると考えられた (図 16B)。しかしながら、本研

究の結果から、ポリリジン上と比べて、ラミニン上の成長円錐における L1-CAM とアクチン線維の逆行性移動速度が減少することがわかった (図 5A, B, 6A, D, 16C)。よって、ラミニンによるアクチン線維と L1-CAM 間の連結の強化が主要なメカニズムとは考えられない。

細胞外において、L1-CAM とラミニン間の連結が強まると、L1-CAM がラミニン上に固定され、強い牽引力を生み出すというモデルが考えられる。このモデルでは、L1-CAM と相互作用するアクチン線維の逆行性移動速度が減少する。更に、L1-CAM はラミニン上に固定されることから、L1-CAM の逆行性移動速度は減少すると考えられる (図 16C)。本研究の結果から、ラミニン上の成長円錐において、アクチン線維、L1-CAM の逆行性移動速度が減少を示したことから (図 5A, B, 6D, 16B)、L1-CAM とラミニン間の連結による牽引力の発生が、ラミニンによる走触性制御において、重要な役割を担うと考えられる。

## 2) L1-CAM とラミニン間の連結と滑りを介した軸索ガイダンスメカニズムの新規性について

これまで細胞接着分子 L1-CAM と細胞外基質ラミニン間の相互作用時における、L1-CAM の分子動態は明らかではなかった。そこで、ポリリジン、ラミニン上の成長円錐における L1-CAM の逆行性移動過程における動態を解析したところ、各基質上の成長円錐において、L1-CAM はグリップとスリップを繰り返していることが明らかとなった (図 6A)。L1-CAM は逆行性に移動しており、停止した後に、再度、動き出すという特徴的な分子動態を示す (図 6A)。更に、L1-CAM がグリップしているフェーズとスリップしているフェーズの割合を解析したところ、ポリリジン上と比べて、ラミニン上において、L1-CAM がグリップしているフェーズの割合が増加し、スリップしているフェーズの割合が減少を示した (図 6B)。このことから、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスにおいて、L1-CAM とラミニン間の連結と滑りが重要な役割を担うことが示唆された。これまで移動性細胞では、細胞接着分子インテグリンによって構成される接着斑が牽引力を生み出し、細胞移動を促進していることが示唆されていた (Gardel et al., 2010)。成長円錐においては、接着斑は **point contact** と呼ばれる。成長円錐において、**point contact** は停止しており、逆行性には動かずに、アクチン線維の逆行性移動と相互作用して、牽引力を生み出すと考えられている (Nichol et al., 2016)。一方、本研究から、細胞接着分子である L1-CAM が逆行性に動く過程で、グリップとスリップを頻繁に繰り返しながら成長円錐が移動するための推進力を得ていることがわかった。更に、L1-CAM halotag と EGFP-actin の逆行性移動の同時励起イメージングにより L1-CAM halotag と EGFP-actin はほぼ同じ速度で逆行性移動することが分かった (図 8A, B, C)。またポリリジン上と比較

して、ラミニン上において L1-CAM halotag と EGFP-actin の逆行性移動速度は減少した。L1-CAM halotag と EGFP-actin の逆行性移動速度がラミニン基質上で減少し、両分子のその速度はほぼ同じである事を考慮すると、アクチン線維と L1-CAM の間は強固に連結しており、L1-CAM とラミニン間で頻繁に滑りが生じていると考えられる。このことから、L1-CAM、Shootin1a および Cortactin から構成される牽引力制御機構は、アクチン線維との間で滑りが生じるインテグリンから構成される牽引力制御機構とは異なる、牽引力制御システムであることが示唆された。

L1-CAM は逆行性に移動する過程でラミニンと相互作用すること、またラミニン上において成長円錐は強い牽引力を生み出すことから、L1-CAM は、細胞外基質を認識するケモセンサーとして、また牽引力を生み出すメカノインデューサーとして機能していると考えられる。本研究で明らかとなった L1-CAM のラミニン基質上におけるグリップとスリップを介した牽引力の制御機構は、これまでに報告のない新たなメカニズムであり、走触性を介した細胞移動及び軸索ガイダンスの理解促進の一助となると期待される。

### 3) $\Delta$ T273 L1-CAM 変異による L1 症候群発症メカニズム

L1-CAM における T273 の欠失は、L1 症候群を発症した胎児において同定された (Yamasaki et al., 2011 ; Itoh et al, 2015)。T273 が欠失した L1-CAM を持つ胎児は、21 週齢で死亡している。よって、T273 の欠失は正常な L1-CAM 機能に重篤な異常をもたらす変異であると考えられる。L1-CAM とラミニン間の相互作用部位は明らかではないが、T273 欠失により L1-CAM とラミニン間の相互作用が減少したことから(図 10A, B, C)、T273 が位置する 3 番目の Ig like ドメインはラミニンとの相互作用に関与している可能性が高い。

本研究において、 $\Delta$ T273 L1-CAM は L1-CAM wild type と比べて、ラミニン上の成長円錐において、グリップするフェーズの割合が減少し、スリップするフェーズの割合が有為に上昇を示した (図 12A, B)。更に、 $\Delta$ T273 L1-CAM の逆行性移動速度は、L1-CAM wild type と比べて、速かった (図 12C)。また、 $\Delta$ T273 L1-CAM を発現させた神経細胞の成長円錐において、ラミニン上における牽引力は低下を示した (図 14)。以上の結果から、 $\Delta$ T273 L1-CAM 変異により、成長円錐とラミニン基質間の接着力が低下することが示唆される。続いて、六角形状のラミニンのマイクロパターンニング基質を用いて、ラミニンによる走触性制御を介した軸索ガイダンスにおける  $\Delta$ T273 L1-CAM 変異の影響を解析したところ、 $\Delta$ T273 L1-CAM 発現によりラミニンを介した軸索ガイダンスが抑制された (参考資料 4A, B)。また、ラミニン/ポリリジン境界に位置した成長円錐における  $\Delta$ T273 L1-CAM 発現の効果を解析したところ、ラミニン側に位置した  $\Delta$ T273 L1-

CAMを発現させた多くの神経細胞の成長円錐は、ラミニン/ポリリジン境界において、ラミニン上を移動せずに、ラミニンからポリリジン側へ移動した(図15A)。以上の結果から、L1-CAMとラミニン間の相互作用を介した走触性制御の破綻による軸索ガイダンス異常が、L1症候群の発症原因となっている可能性が考えられる。

L1症候群の症状の一つに半身麻痺があるが、半身麻痺になる原因として、大脳皮質と脊髄の接続異常が考えられる。大脳皮質から脊髄へ向かう軸索は、後脳と脊髄の境界において、腹側から背側へと方向転換し、舌下神経核を迂回して脊髄へと移動する。しかしながら、L1-CAMノックアウトマウスでは、一部は正常な経路をたどるが、多くの軸索は背側へ方向転換できずに、反対側の錐体へ移動する(Cohen et al., 1998)。このような脊髄錐体交叉異常は、L1-CAMの細胞外基質上におけるグリップとスリップを介した走触性制御の破綻により、軸索成長円錐が本来の経路を辿れず、目的地を見失ってしまったことが原因として考えられる。

L1症候群患者のL1-CAMに見られる変異は、分子内部の疎水性アミノ酸から親水性アミノ酸への置換による電気的かつ立体的な歪みなどの要因により、L1-CAMの構造に影響を与えると考えられている。一方で、分子表面の親水性領域のサイズと形状の変化などによって、L1-CAM分子の表面特性に影響を与えると考えられている変異もある(Bateman et al., 1996)。今後、 $\Delta T273$  L1-CAMとラミニン間の相互作用を構造レベルで解析することで、L1-CAMを介した走触性制御の詳細な理解が得られると期待できる。

#### 4) 結論

これまで、ラミニン依存的に軸索伸長及びガイダンスが生じることが報告されていたが、その走触性の分子メカニズムの理解は進んでいなかった。本研究の結果から、成長円錐に局在するL1-CAMが、ポリリジンと比較して、ラミニンと強く連結することで、成長円錐の生み出す牽引力を強め、走触性を介した軸索ガイダンスに関与していることが示唆された。更に、成長円錐L1-CAMのラミニン上におけるグリップの低下が、L1症候群の発症原因のひとつであることが示唆された。

今後、野生型L1-CAM及び $\Delta T273$  L1-CAMとラミニン間の相互作用を構造レベルで明らかにすることで、L1症候群の発症のメカニズム及び、L1-CAMとラミニン間の相互作用を介した軸索ガイダンスのメカニズムの理解をより深められると考えられる。

## 5) 参考資料

資料1: マイクロパターン化したラミニンによる軸索ガイダンス機構

資料2: ミオシンII阻害時のラミニン上における軸索ガイダンス異常

資料3: アクチン重合阻害時のラミニン上における軸索ガイダンス異常

資料4:  $\Delta T273$  L1-CAM 発現によるラミニン上における軸索ガイダンス異常

## <謝辞>

奈良先端科学技術大学院大学における大学院生活において、関わった全ての皆様にこの場を借りて、感謝申し上げます。特に、主指導教官である神経システム生物学研究室の稲垣直之教授には、整備された研究環境において、研究の進め方、研究室の持つスピリットやオリジナリティーのある研究についてなど、研究する上で大切なことを教えていただきました。心から、感謝申し上げます。更に、鋭いご指摘、アドバイスを頂き、研究に対する理解を促進して頂いたアドバイザー委員の遺伝子発現制御研究室の別所康全教授、発生医科学研究室の笹井紀明准教授には、この場を借りて感謝申し上げます。また、研究における様々なディスカッションやマイクロパターンニングを用いたバイオアッセイの立ち上げから解析までを行って頂いた、共同研究者の勝野弘子博士研究員、L1-CAM とラミニン間の相互作用解析に尽力を頂いた馬場健太郎博士研究員、L1 症候群患者由来の神経幹細胞の提供や、L1-CAM 変異体の遺伝情報などを提供していただいた大阪医療センター再生医療研究室室長の金村米博博士には、この場を借りて、感謝申し上げます。また、浦崎明宏助教、鳥山道則助教、久保祐亮研究員、前野貴則研究員には、テクニカルな実験のサポートとディスカッション、解析方法など様々なことを教えて頂きました。深く感謝申し上げます。更に、切磋琢磨しながら、共に研究生活を送った神経システム生物学研究室内の学生の皆様には、この場を借りて感謝申し上げます。最後に、長年の学生生活を経済的に支えてくれた両親に心から感謝致します。

## <参考文献>

Alexander, C. M., Birk, E. D., Farquhar, G. M., Hascall, V. C., Hay, D. E., Heinegard, D. D., Heuser, J. E., Linsenmayer, T. F., Mecham, R. P., Olsen, B. R., Ruoslahti, E., Silver, F. H., Toole, B. P., Trelstad, R. L., Werb, Z., Wight, T. N., Yamada, K. M. (1991). *Cell Biology of Extracellular Matrix* second edition, Hay, E. D., ed. (New York: Plenum Press), pp. 124-127.

Bateman, A., Jouet<sup>1</sup>, M., MacFarlane<sup>1</sup>, J., Du<sup>1</sup>, J. S., Kenwrick, S., and Chothia, C. (1996). Outline structure of the human L1 cell adhesion molecule and the sites where mutations cause neurological disorders. *EMBO J.* 15, 6050-6059.

Cai, D., Chen, S. C., Prasad, M., He, L., Wang, X., Cadamuro, V. C., Sawyer, J. K., Danuser, G. and Montell, D. J. (2014). Mechanical feedback through E-cadherin promotes direction sensing during collective cell migration. *Cell* 157, 1146-1159.

Carter, S. B. (1967). Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature* 213, 256-260.

Chan, C. E., and Odde, D. J. (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* 322, 1687

Chen, Z. L., Haegeli, V., Yu, H., Strickland, S. (2009). Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3beta signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev. Biol.* 327, 158-168.

Chen, Z. L., Indyk, J. A., and Strickland, S. (2003). The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival. *Mol. Biol. Cell* 14, 2665-2676.

Cheng, L., and Lemmon, V. (2004). Pathological missense mutations of neural cell adhesion molecule L1 affect neurite outgrowth and branching on an L1 substrate. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 522-530.

Cirulli, V., and Yebra, M. (2007). Netrins: beyond the brain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 296-306.



Clainche, C. L., Carlier, M. F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* 88, 489-513.

Cohen, N.R., Taylor, J.S.H., Scott, L.B., Guillery, R.W., Soriano, P., and Furley, A. J. W. (1998). Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr. Biol.* 8, 26-33.

Craig, E. M., Goor, D. V., Forscher, P., Mogilner, A. (2012). Membrane tension, myosin force, and actin turnover maintain actin treadmill in the nerve growth cone. *Biophys. J.* 102, 1503-1513.

Dertinger, S. K., Jiang, X., Li, Z., Murthy, V. N., Whitesides, G. M. (2002). Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12542-12547.

Dotti, C. G., Sullivan, C. A., and Banker, G., A. (1988). The Establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8, 1454-1468.

Esch, T., Lemmon, V., Banker, G. (1999). Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19, 6417-6426.

Forscher, P., and Smith, S. J. (1988). Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J. Cell Biol.* 107, 1505-1516.

Fransen, E., Camp, G. V., Vits, L., and Willems, P. J. (1997). L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1625-1632.

Garcia, M., Leduc, C., Lagardère, M., Argento, A., Sibarita, J. B., and Thoumine, O. (2015). Two-tiered coupling between flowing actin and immobilized N-cadherin/catenin complexes in neuronal growth cones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 6997-7002.

Gardel, M. L., Schneider, I. C., Schaus, Y. A., and Waterman, C. M. (2010). Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 315-333.

Hall, H., Carbonetto, S., Schachner, M. (1997). L1/HNK-1 carbohydrate- and beta 1

integrin-dependent neural cell adhesion to laminin-1. *J. Neurochem.* 68, 544-553.

Higashiguchi, Y., Katsuta, K., Minegishi, T., Yonemura, S., Urasaki, A., Inagaki, N. (2016). Identification of a shootin1 isoform expressed in peripheral tissues. *Cell Tissue Res.* 366, 75-87.

Huber, A. B., Kolodkin, A. L., Ginty, D. D., and Cloutier, J. F. (2003). Signaling at the growth cone : ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 509-563.

Itoh, K., and Fushiki, S. (2015) The role of L1cam in murine corticogenesis, and the pathogenesis of hydrocephalus. *Pathol. Int.* 65:58-66.

Kamiguchi, H., Hlavin, M. L., Yamasaki, M., Lemmon, V. (1998). Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 97-125.

Kubo, Y., Baba, K., Toriyama, M., Minegishi, T., Sugiura, T., Kozawa, S., Ikeda, K., Inagaki, N. (2015). Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *J. Cell Biol.* 210, 663-676.

Lamoureux, P., Ruthel, G., Buxbaum, R. E., and Heidemann, S. R. (2002). Mechanical tension can specify axonal fate in hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 159, 499-508.

Lathia, J. D., Patton, B., Eckley, D. M., Magnus, T., Mughal, M. R., Sasaki, T., Caldwell, M. A., Rao, M. S., Mattson, M. P., and Constant, C. F. (2007). Patterns of laminins and integrins in the embryonic ventricular zone of the CNS. *J. Comp. Neurol.* 505, 630-643.

Lemmon, V., Farr, K. L., Lagenaur, C. (1989). L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-1603.

Lowery, L. A., Vactor, D. V. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 332-342.

Maness, P. F., Schachner, M. (2007). Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. *Nat. Neurosci.* 10, 19-26.

Medeiros, N. A., Burnette, D. T., Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat. Cell Biol.* 8, 215-226.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761-772.

Myers, J. P., Santiago-Medina, M., Gomez, T. M. (2011). Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions. *Dev. Neurobiol.* 71, 901-923.

Myers, J. P., Robles, E., Smith, A. D., and Gomez, T. M. (2012). Focal adhesion kinase modulates Cdc42 activity downstream of positive and negative axon guidance cues. *J. Cell Sci.* 125, 2918-2929.

Namba, T., Kibe, Y., Funahashi, Y., Nakamuta, S., Takano, T., Ueno, T., Shimada, A., Kozawa, S., Okamoto, M., Shimoda, Y., Oda, K., Wada, Y., Masuda, T., Sakakibara, A., Igarashi, M., Miyata, T., Sarrailh, C. F., Takeuchi, K., Kaibuchi, K. (2014). Pioneering axons regulate neuronal polarization in the developing cerebral cortex. *Neuron* 81, 814-829.

Nichol IV, R. H. K., Hagen, M., Lombard, D. C., Dent, E. W., Gomez, T. M. (2016). Guidance of axons by local coupling of retrograde flow to point contact adhesions. *J. Neurosci.* 36, 2267-2282.

Patzke, C., Acuna, C., Giam, L. R., Wernig, M., Südhof, T. C. (2016). Conditional deletion of LICAM in human neurons impairs both axonal and dendritic arborization and action potential generation. *J. Exp. Med.* 213, 499-515.

Pollard, T. D., Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.

Randlett, O., Poggi, L., Zolessi, F. R., Harris, W. A. (2011). The oriented emergence of axons from retinal ganglion cells is directed by laminin contact in vivo. *Neuron* 70, 266-280.

Schaefer, A. W., Schoonderwoert V. T., Ji, L., Mederions, N., Danuser, G., Forscher, P.

(2008). Coordination of actin filament and microtubule dynamics during neurite outgrowth. *Dev. Cell* 15, 146-162.

Shimada, T., Toriyama, M., Uemura, K., Kamiguchi, H., Sugiura, T., Watanabe, N., Inagaki, N. (2008). Shootin1 interacts with actin retrograde flow and L1-CAM to promote axon outgrowth. *J. Cell Biol.* 181, 817-829.

Sun, G. J., Sailor A, K., Mahmood, A. Q., Chavali, N., Christian, M. K., Song, H., Ming, G. (2013). Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *J. Neurosci.* 33, 11400-11411.

Timpl, R., and Rohde, H. (1979). Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* 254, 9933-9937.

Toriyama, M., Kozawa, S., Sakumura, Y., Inagaki, N. (2013). Conversion of a signal into forces for axon outgrowth through Pak1-mediated shootin1 phosphorylation. *Curr. Biol.* 23, 529-534.

Toriyama, M., Sakumura, Y., Shimada, T., Ishii, S., and Inagaki, N. (2010). A diffusion-based neurite length-sensing mechanism involved in neuronal symmetry breaking. *Mol. Syst. Biol.* 6, 394.

Toriyama, M., Shimada, T., Kim, KB., Mitsuba, M., Nomura, E., Katsuta, K., Sakumura, T., Roepstorff, P., Inagaki, N. (2006). Shootin1: A protein involved in the organization of an asymmetric signal for neuronal polarization. *J. Cell Biol.* 175, 147-157.

Turney, S. G., Bridgman, P. C. (2005). Laminin stimulates and guides axonal outgrowth via growth cone myosin II activity. *Nat. Neurosci.* 8, 717-719.

Welniarz, Q., Dusart, I., Roze, E. (2016). The corticospinal tract: Evolution, development, and human disorders. *Dev. Neurobiol.* 7, 810-829.

Weston, C. A., Anova, L., Rialas, C., Prives, J. M., Weeks, B. S. (2000). Laminin-1 activates Cdc42 in the mechanism of laminin-1-mediated neurite outgrowth. *Exp. Cell Res.* 260, 374-378.

Yamasaki, M., Nonaka, M., Suzumori, N., Nakamura, H., Fujita, H., Namba, A., Kamei, Y., Yamada, T., K. Pooh, R., Tanemura, M., Sudo, N., Nagasaka, M., Yoshioka, E., Shofuda, T., Kanemura, Y. (2011) Prenatal molecular diagnosis of a severe type of L1 syndrome (X-linked hydrocephalus). *J. Neurosurg. Pediatr.* 8:411-416.

## 图表

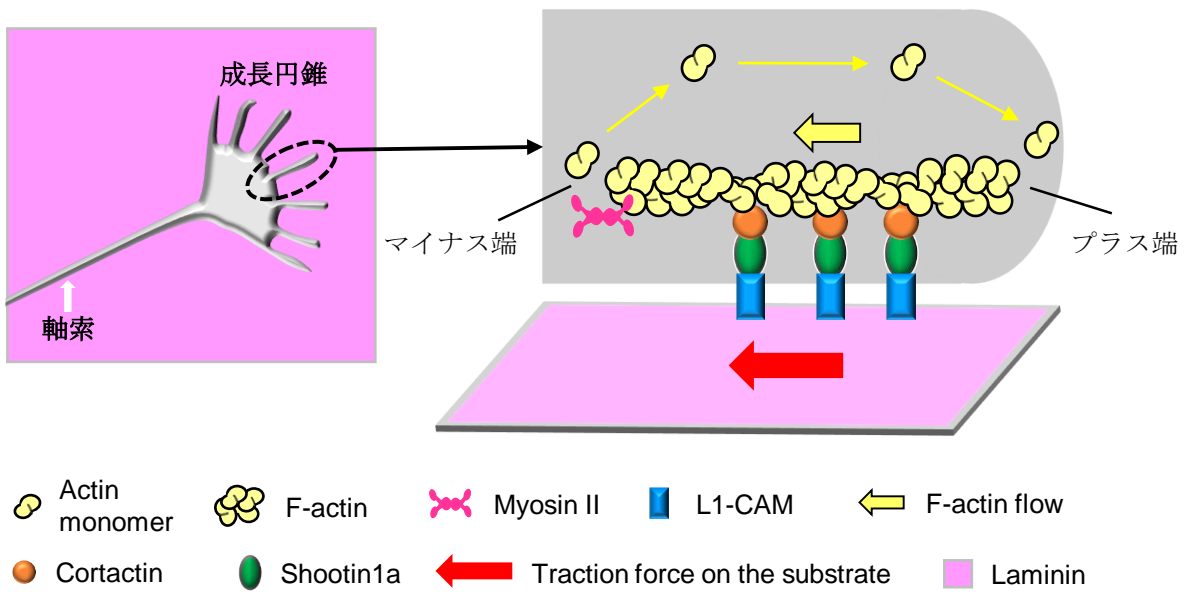


図1. ラミニン上における軸索伸長機構のモデル

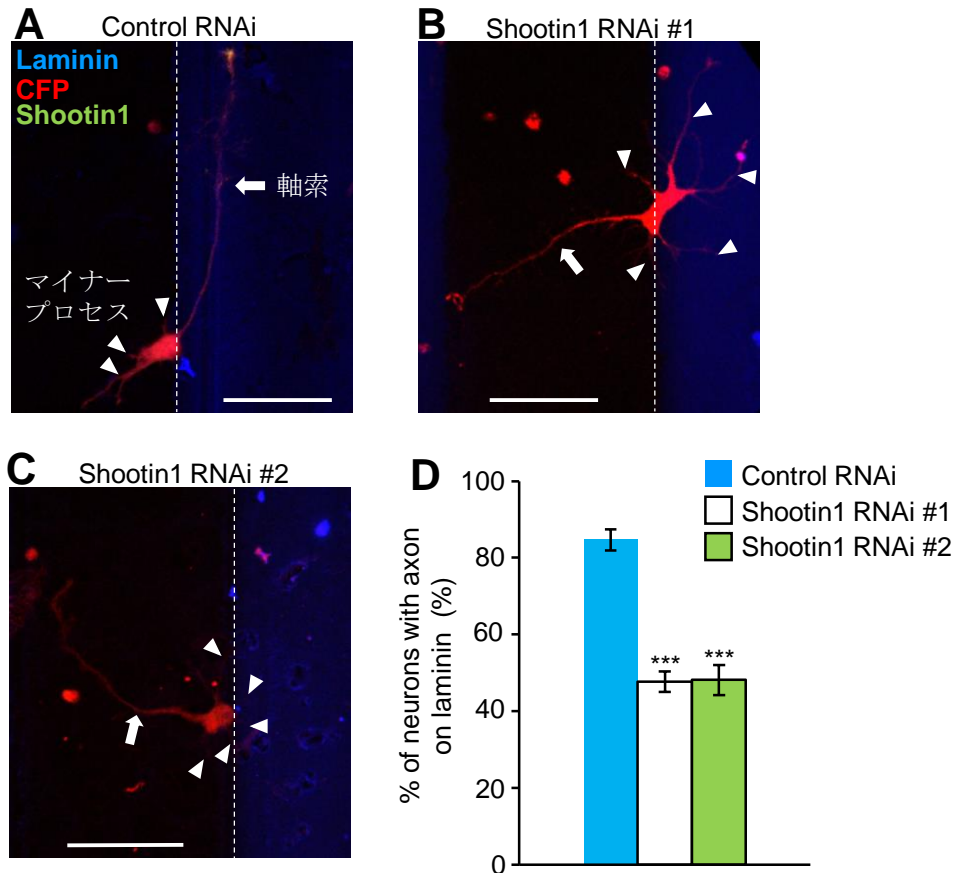


図2. ラミニンに誘導される軸索形成におけるShootin1 miRNAの阻害効果

(A), (B), (C) ラミニンに誘導される軸索形成におけるControl miRNA, Shootin1 miRNA #1, Shootin1 miRNA #2の影響を示す。青：ラミニン領域、黒：ポリリジン領域、赤：CFP、緑：Shootin1、破線：ラミニンとポリリジン基質の境界、矢印：軸索、矢頭：マイナープロセス (D)ラミニンに誘導される軸索形成におけるControl miRNA, Shootin1 miRNA #1, Shootin1 miRNA #2の効果を示す。 (\*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test) Bars: 50 $\mu$ m



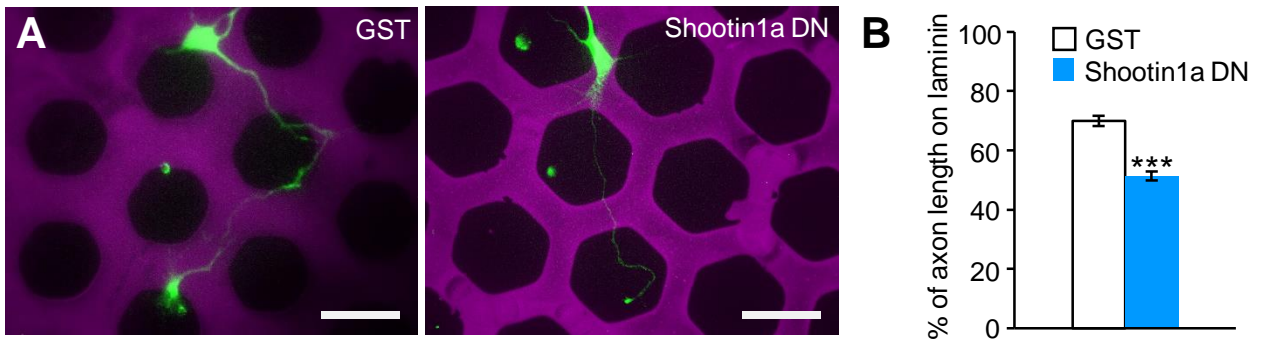


図3. Shootin1a と Cortactin間の連結阻害による軸索ガイダンスへの影響

(A) Myc-NES-GST、Myc-NES-Shootin1aドミナントネガティブ変異体 (DN) (261-377)を発現させた神経細胞の六角形状のラミニンマイクロパターン基質上における軸索ガイダンスを示す。緑：抗myc抗体による染色 マゼンダ：ラミニン領域 (B) Myc-NES-GST、Myc-NES-Shootin1a DN (261-377)を発現させた神経細胞のラミニン上における軸索の長さの割合を示す。(\*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's *t*-test) Bars: 50 $\mu$ m

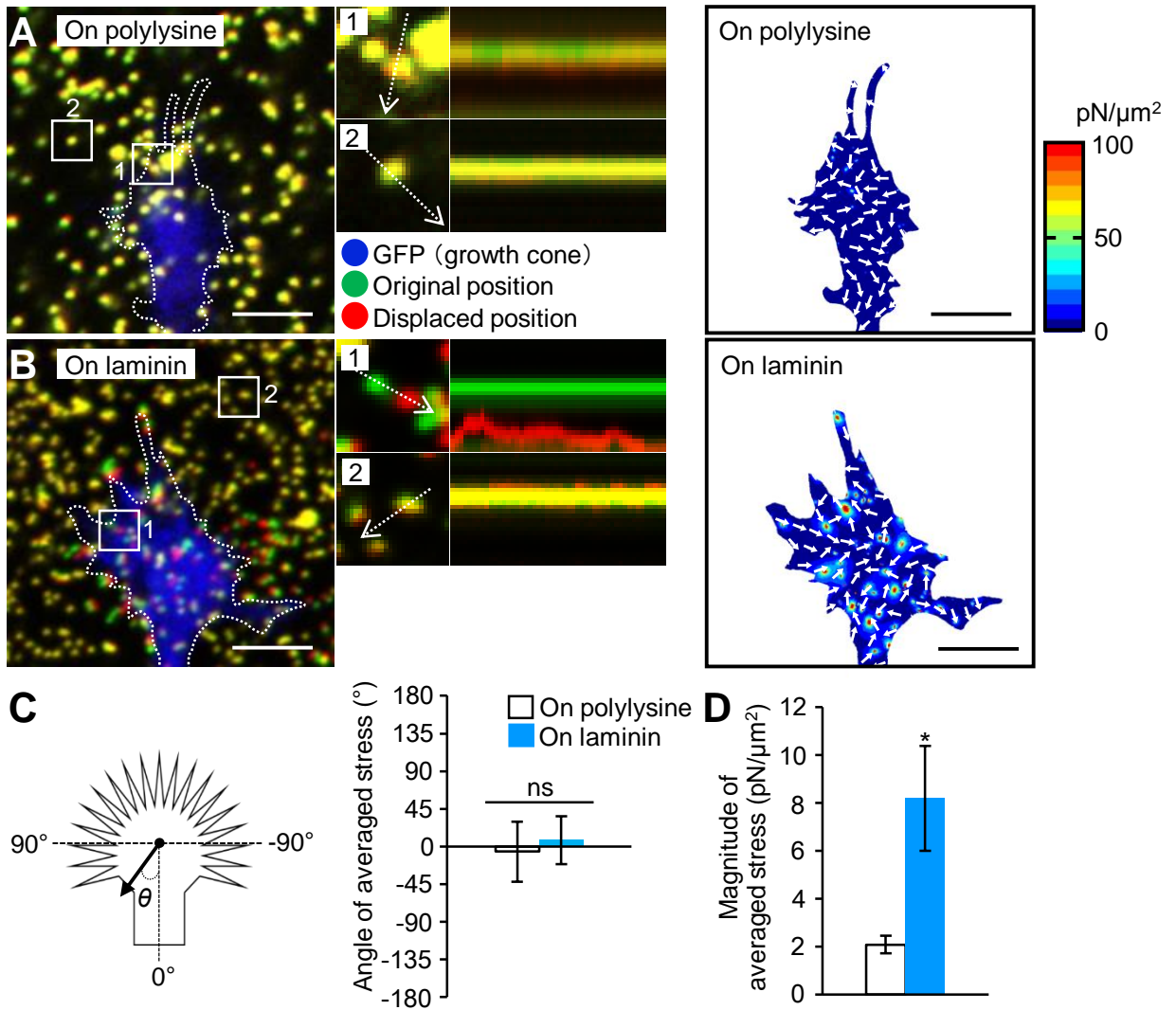


図4. ポリリジン及びラミニン上の成長円錐が生み出す牽引力の定量

(A) ポリリジン上の成長円錐直下のビーズの変位を示す。(A1) 成長円錐直下のビーズを示し、(A2) は成長円錐の領域と重ならない位置のビーズを示す(コントロール)。青: 成長円錐で発現するGFPタンパク質(成長円錐のマーカー) 緑のビーズ: ビーズの初期位置 赤のビーズ: 変位後のビーズ位置 矢印: ビーズの動く方向 牽引力の大きさの平均は、ヒートマップとして示した。(B) ラミニン上の成長円錐が生み出す牽引力を示す。(C) 各基質上の成長円錐が生み出す牽引力のベクトルの向きを示す。(D) ポリリジン及びラミニン上の成長円錐の生み出す牽引力の大きさの平均を示す。(ns: 有意差なし, \*,  $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test) Bars: 5μm

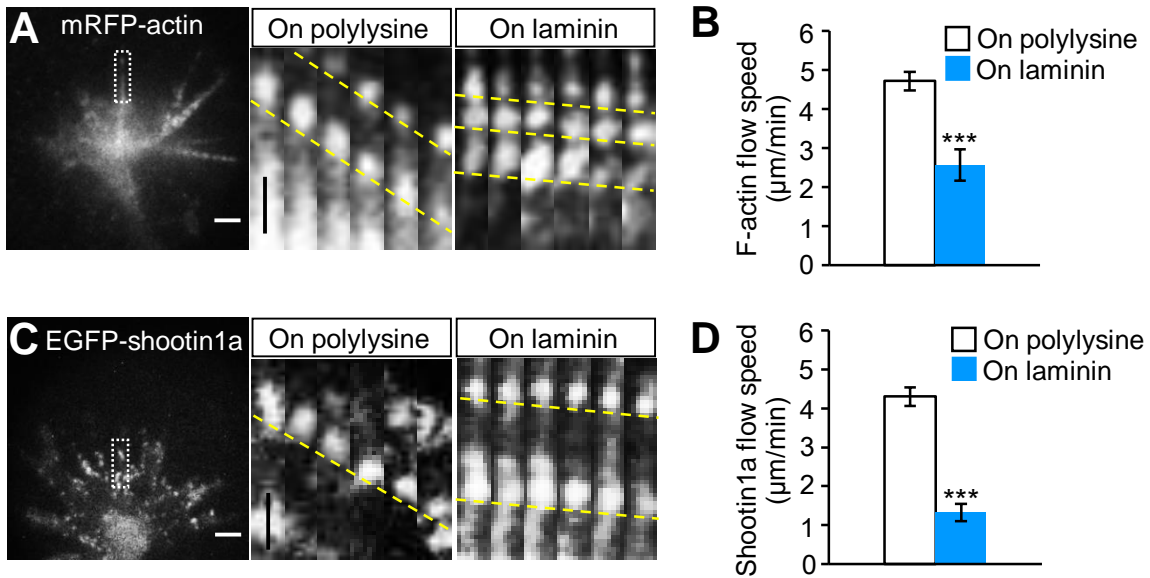


図5. ポリリジン及びラミニン上の成長円錐におけるmRFP-actin、EGFP-shootin1aの逆行性移動速度の解析

(A) ポリリジン、ラミニン各基質上の成長円錐におけるmRFP-actinの逆行性移動を示す。黄色の破線：mRFP-actinの逆行性移動の軌道 (B) 各基質上の成長円錐における線維状アクチンの逆行性移動速度 (μm/min)を示す。(C) 各基質上の成長円錐におけるEGFP-shootin1aの逆行性移動を示す。黄色の破線：EGFP-shootin1aの逆行性移動の軌道 (D) 各基質上の成長円錐におけるEGFP-shootin1aの逆行性移動速度 (μm/min)を示す。(\*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test) Bars: 5μm

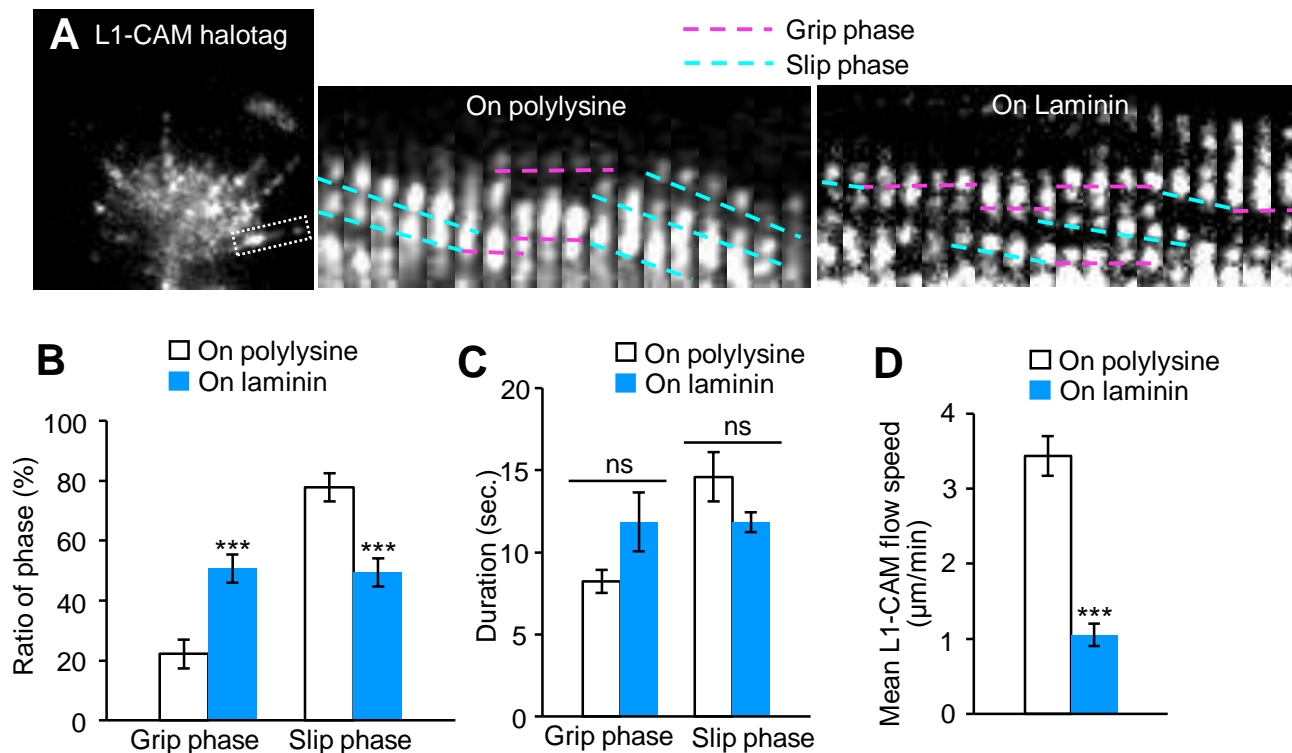


図6. ポリリジン及びラミニン上の成長円錐におけるL1-CAM halotagの逆行性移動動態の解析

(A) ポリリジン及びラミニン上の成長円錐におけるL1-CAM halotagの逆行性移動を示す。ピンクの破線：グリップフェーズ 水色の破線：スリップフェーズ  
 (B) L1-CAM halotagのグリップフェーズとスリップフェーズの割合を示す。  
 (C) 各基質上におけるL1-CAM halotagのグリップフェーズとスリップフェーズの持続時間を示す。  
 (D) 各基質上におけるグリップとスリップの両フェーズを含めたL1-CAM halotagの逆行性移動速度 (μm/min)を示す。 (\*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test, ns: 有意差なし) Bars: 5μm

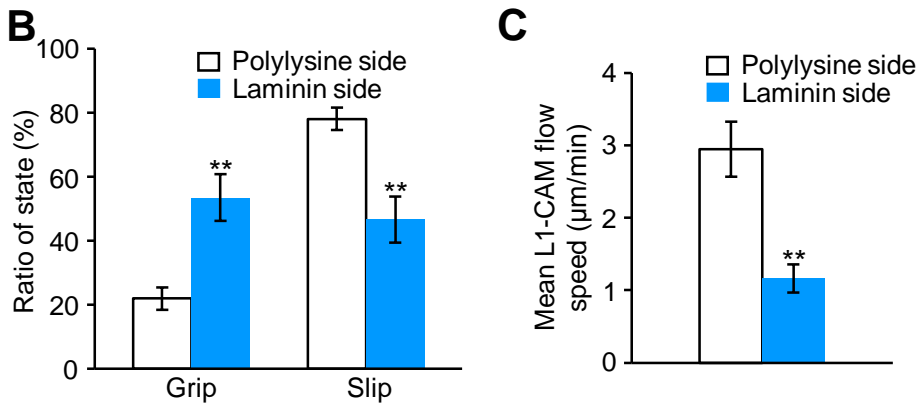
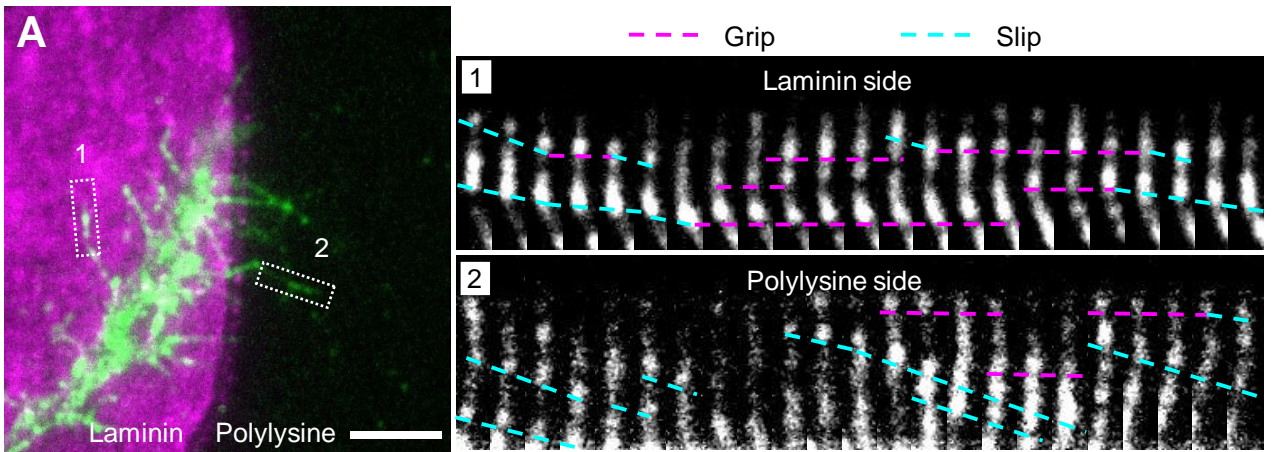


図7. ラミニン/ポリリジン境界上の同一の成長円錐におけるL1-CAMの逆行性移動動態の解析

(A) ラミニン/ポリリジン境界上の成長円錐のフィロポディアにおけるL1-CAM halotagの逆行性移動を示す。緑：L1-CAM halotag、マゼンダ：ラミニン領域、黒：ポリリジン領域 (A1) ラミニン上のフィロポディアにおけるL1-CAMの分子動態 (A2) ポリリジン上のフィロポディアにおけるL1-CAMの分子動態 ピンクの破線：グリップフェーズ、水色の破線：スリップフェーズ (B) L1-CAM halotagの逆行性移動過程におけるグリップとスリップフェーズの割合を示す。 (C) 各基質上の成長円錐におけるグリップとスリップの両フェーズを含めたL1-CAM halotagの逆行性移動速度を示す。 (\*\*,  $p < 0.02$ , Student's *t*-test) Bar: 5μm

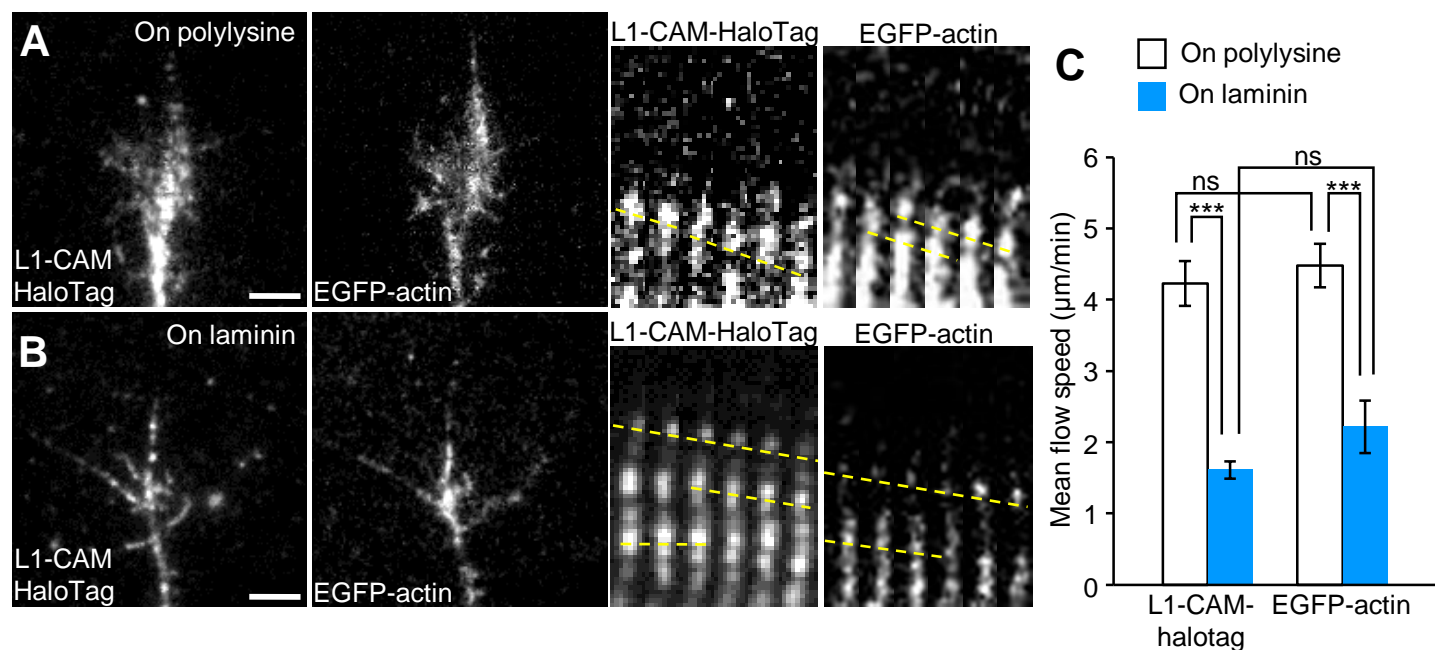


図8. L1-CAM-halotagとEGFP-actinの同時励起イメージングによる逆行性移動速度の比較解析

(A) L1-CAM-halotagとEGFP-actinを共発現させた神経細胞の成長円錐におけるポリリジン上の各分子の逆行性移動を示す。黄色の破線：L1-CAM-halotag、EGFP-actinの逆行性移動の軌道 (B) L1-CAM-halotagとEGFP-actinを共発現させた神経細胞の成長円錐におけるラミニン上の各分子の逆行性移動を示す。黄色線：各分子の逆行性移動の軌道 (C) ポリリジン、ラミニン各基質におけるL1-CAM HaloTagとEGFP-actinの逆行性移動速度を示す。白色：ポリリジン上の各分子の逆行性移動速度 水色：ラミニン上における各分子の逆行性移動速度 (\*\*\*,  $P < 0.01$ ; ns: 有意差なし, one-way ANOVA with Schaffer's post hoc test) Bars: 5µm

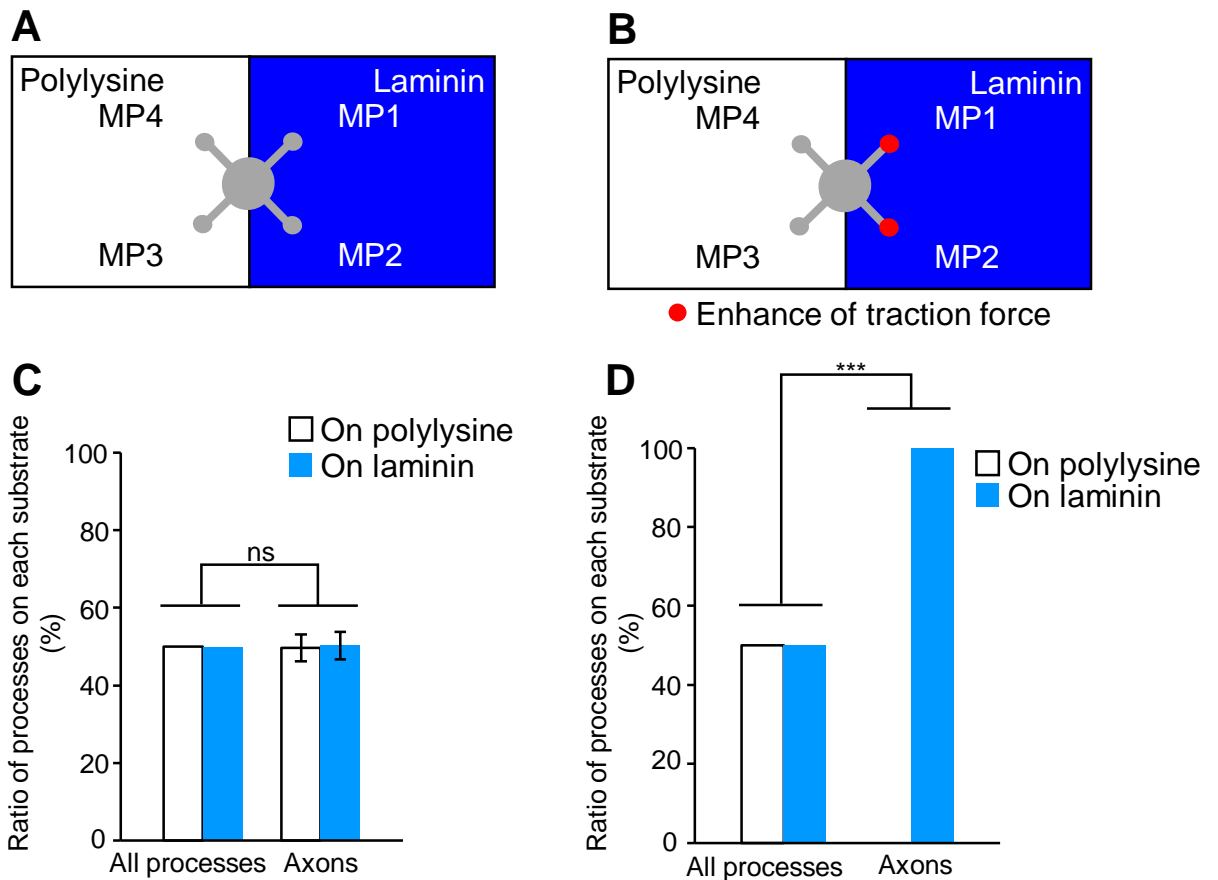


図9. 軸索形成の数理モデルを用いたラミニンに誘導される軸索形成のシミュレーション解析

(A), (B) ラミニン/ポリリジン ストライプ基質上の神経細胞における軸索形成のシミュレーションのイメージ図を示す。神経細胞体はポリリジンとラミニンの境界上に位置させた。青：ラミニン領域、白：ポリリジン領域、MP1-4：1から4番目のマイナープロセス 赤丸：ラミニン上の成長円錐における牽引力の増強 (C) ポリリジン、ラミニン上の各成長円錐において、同じ $\alpha_s$ 値 (1.306)を用いて行ったシミュレーション結果を示す。D. ポリリジン、ラミニン上の各成長円錐において、それぞれ推定した $\alpha_s$ 値 (ラミニン：5.1003、ポリリジン：1.3062)を用いて行ったシミュレーション結果を示す。 (\*\*\*,  $p < 0.01$ , ns: 有意差なし,  $\chi^2$  test)

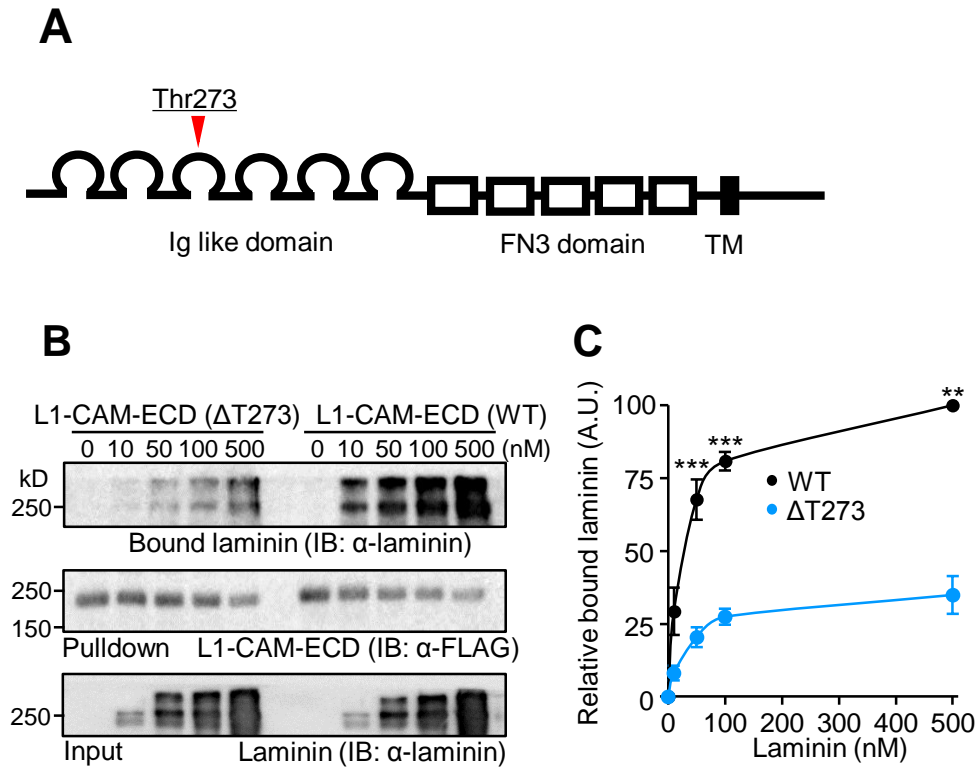


図10.  $\Delta$ T273 L1-CAMとラミニン間の相互作用解析

(A) L1-CAMの二次構造とL1-CAMの273番目のスレオニンの位置関係を示す。Ig likeドメインは免疫グロブリン様ドメイン、FN3ドメインはファイブロネクチンⅢ型ドメイン、TMは膜貫通領域 (Transmembrane領域)を示す。赤矢尻 :  $\Delta$ T273変異部位を示す。(B) 野生型L1-CAM細胞外ドメイン (L1-CAM wild type ECD),もしくは $\Delta$ T273 L1-CAM細胞外ドメイン ( $\Delta$ T273 L1-CAM ECD)と結合したラミニン量の濃度依存的変化を示す。ラミニンは抗ラミニン抗体、L1-CAM-ECDは抗FLAG抗体を用いて検出した。(C) Bで示したL1-CAM wild type ECD,もしくは $\Delta$ T273 L1-CAM-ECDと結合したラミニン量の違いを示す (ImageJを用いて解析) 黒丸 : L1-CAM wild typeと結合した相対的なラミニン量 水色丸 :  $\Delta$ T273 L1-CAM-ECDと結合した相対的なラミニン量 (\*\*,  $p < 0.02$ ; \*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's *t*-test)



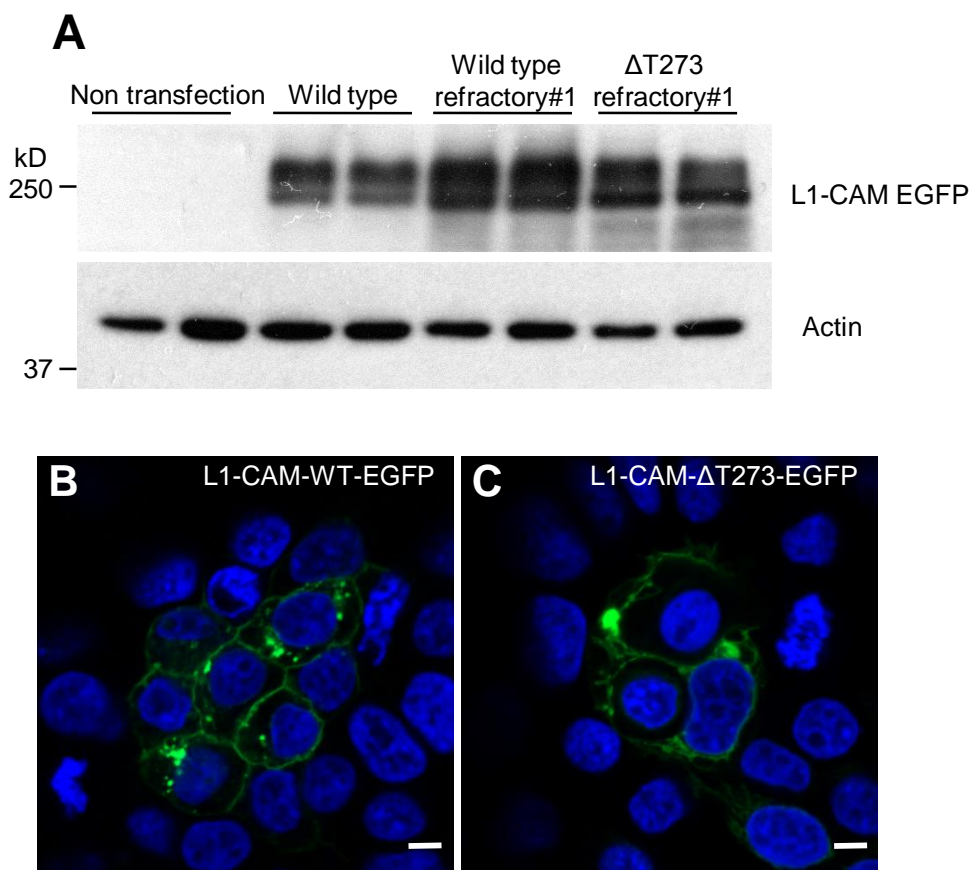


図11. HEK293T細胞における野生型L1-CAM及び $\Delta$ T273 L1-CAMの発現解析

(A) L1-CAM wild type EGFP、L1-CAM wild type refractory #1 EGFP、 $\Delta$ T273 L1-CAM refractory #1 EGFPの抗EGFP抗体を用いたウエスタンブロットにより検出されたバンドパターンを示す。上：各種L1-CAM EGFP 下：アクチン  
 (B) HEK293T細胞におけるL1-CAM wild type refractory #1 EGFP、 $\Delta$ T273 L1-CAM refractory #1 EGFPの細胞膜における局在を示す。緑：各種L1-CAM EGFP、青：DAPI、Bars: 5 $\mu$ m

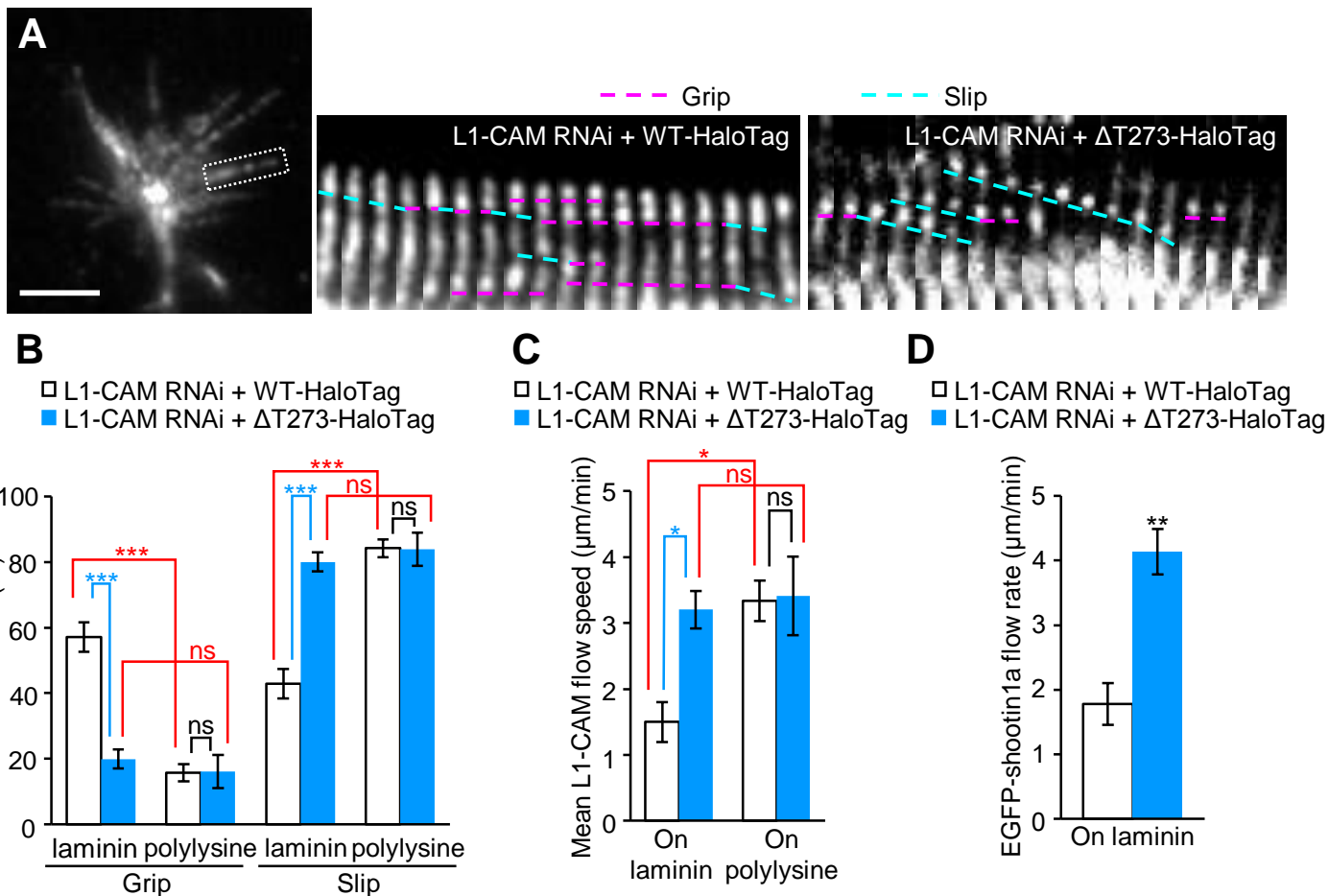


図12. ヒトL1症候群患者で新たに同定された変異を持つΔT273 L1-CAMの分子動態の解析

(A) L1 miRNA #1により、内在性のL1-CAMをノックダウンしたラミニン上の神経細胞におけるL1-CAM Wild type refractory #1 halotag、ΔT273 L1-CAM refractory #1 halotag一分子の動態を示す。水色の破線：スリップフェーズ、ピンクの破線：グリップフェーズ (B) L1-CAM Wild type refractory #1 halotag、ΔT273 L1-CAM refractory #1 halotag一分子のスリップ及びグリップフェーズの時間の割合を示す。(D) L1-CAM Wild type refractory #1 halotagもしくはΔT273 L1-CAM refractory #1 halotagを発現させた神経細胞のラミニン上におけるEGFP-shootin1aの逆行性移動速度を示す。(\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.02$ , \*\*\*,  $p < 0.01$ ; one-way ANOVA with Schaffer's post hoc test) Bars: 5μm

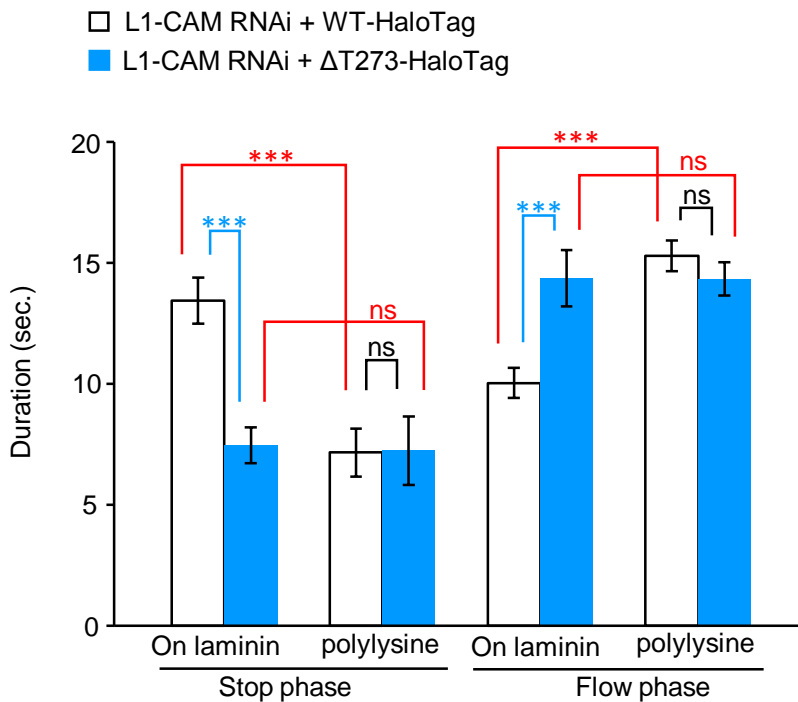
**A**

図13. 各基質上における野生型L1-CAMとΔT273 L1-CAMのグリップとスリップフェーズの持続時間の違い

(A) 各基質上における野生型L1-CAMとΔT273 L1-CAMのグリップとスリップフェーズの持続時間の違いを示す。白: L1-CAM Wild type refractory #1 halotag、水色: ΔT273 L1-CAM refractory #1 halotag (\*\*\*,  $P < 0.01$ ; ns, 有意差なし; one-way ANOVA with Schaffer's post hoc test)

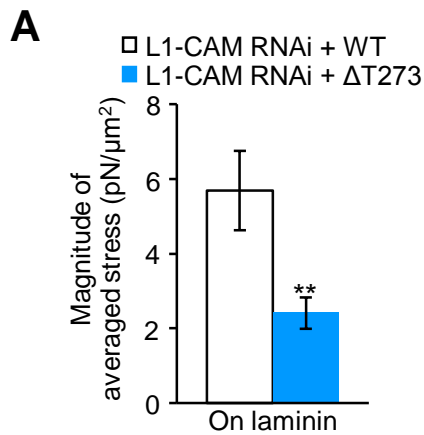


図14.  $\Delta T273$  L1-CAM変異による牽引力の変化

(A)  $\Delta T273$  L1-CAM変異による成長円錐の生み出す牽引力の変化を示す。白色のグラフ: L1-CAM wild type refractory #1 EGFPを発現する成長円錐の牽引力 水色のグラフ:  $\Delta T273$  L1-CAM refractory #1 EGFPを発現する成長円錐の牽引力 (\*\*,  $P < 0.02$ , Student's *t*-test)

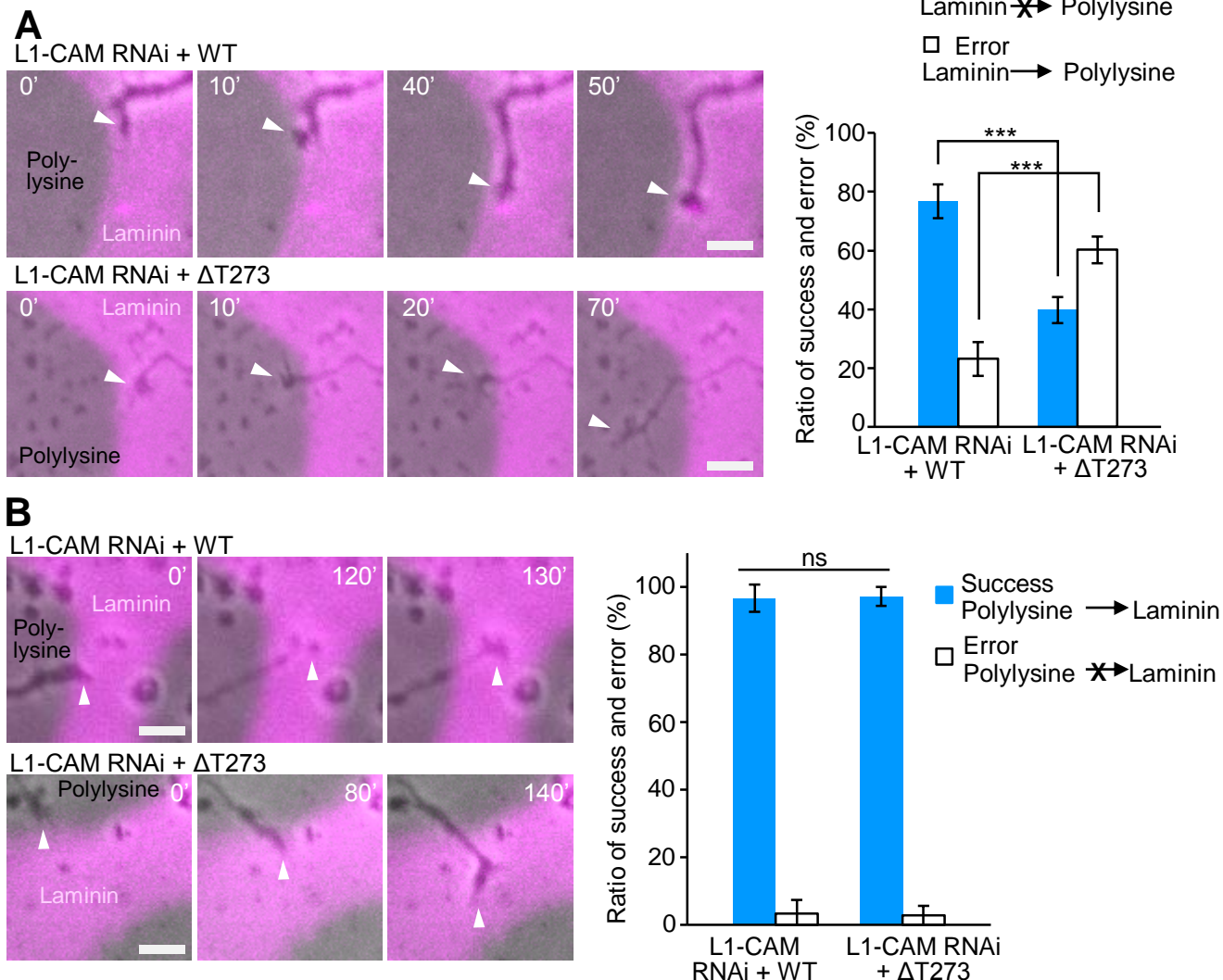


図15. ラミニン/ポリリジン境界における成長円錐の挙動と $\Delta T273$  L1-CAM変異の影響

(A) 野生型L1-CAM (WT)、 $\Delta T273$  L1-CAMを発現させた神経細胞のラミニン領域からポリリジン領域に向かう成長円錐のラミニン/ポリリジン境界における挙動を示す。白矢印：成長円錐、水色のグラフ：ラミニン上をターニングしてポリリジン側へ移動しなかった成長円錐の割合、白色のグラフ：ラミニン側からポリリジン側へ移動した成長円錐の割合 (B) 野生型L1-CAM (WT)、 $\Delta T273$  L1-CAMを発現させた神経細胞のポリリジン側からラミニン側に向かう成長円錐のラミニン/ポリリジン境界における挙動を示す。白矢印：成長円錐、水色のグラフ：ポリリジンからラミニン側へ移動した成長円錐の割合、白色のグラフ：ポリリジン上をターニングしてラミニン側へ移動しなかった成長円錐の割合 (インターバル：10min, \*\*\*,  $p < 0.01$ ; ns, 有意差なし, Student's *t*-test) Bars : 10 $\mu$ m

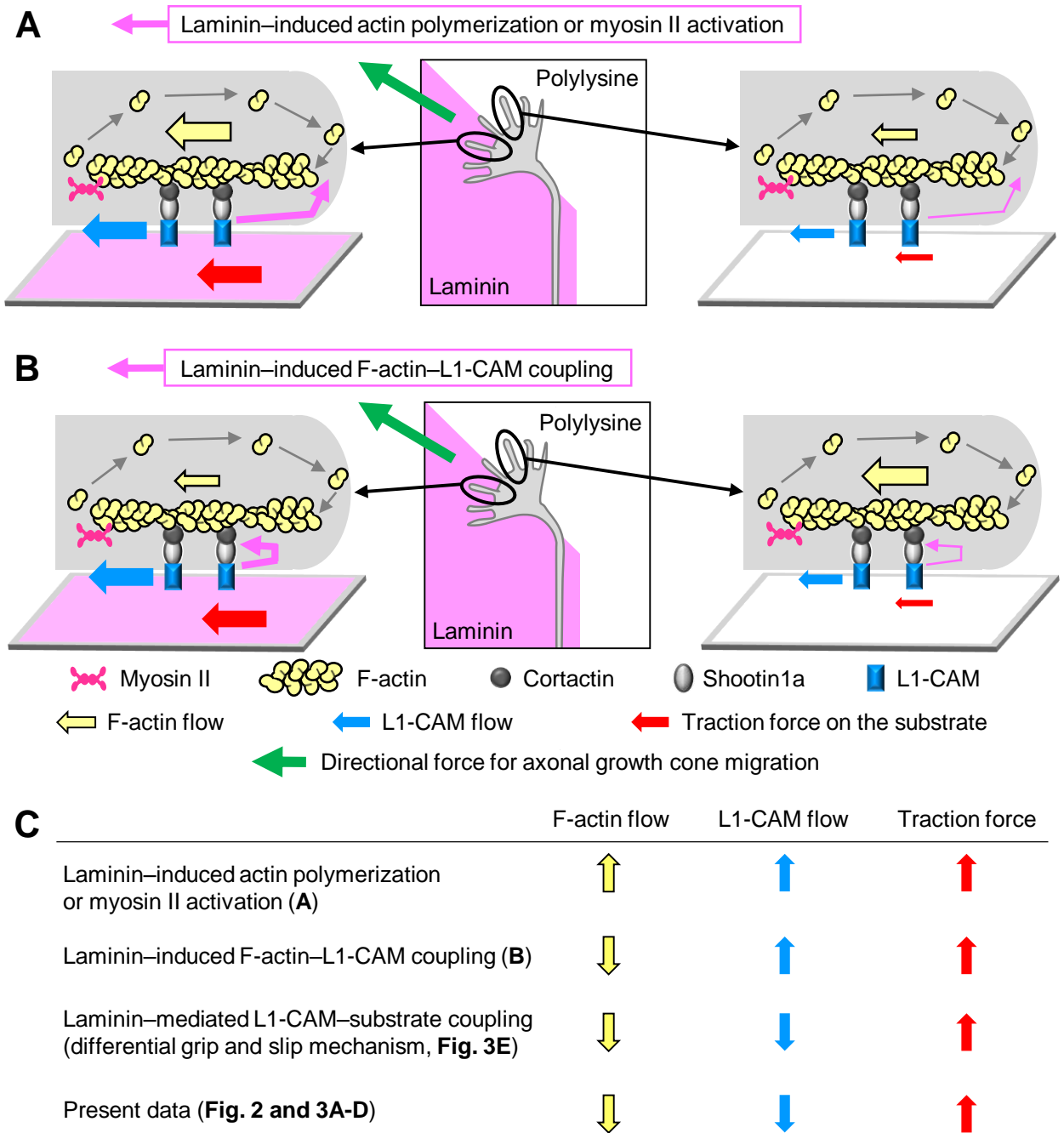
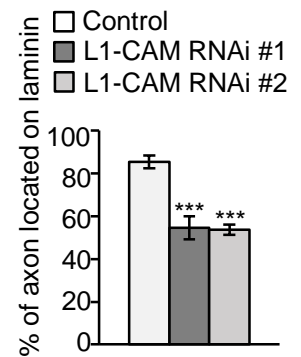
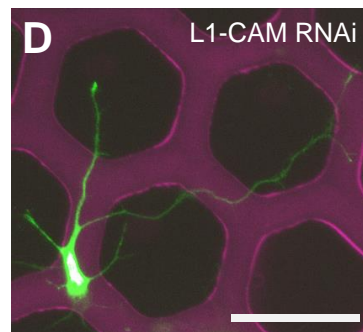
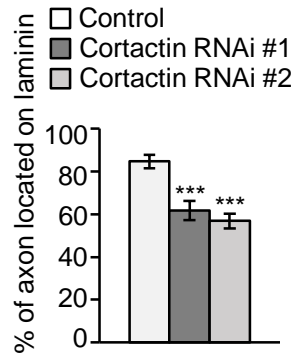
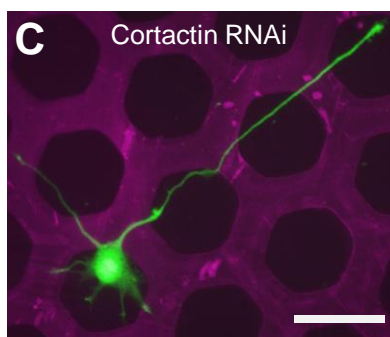
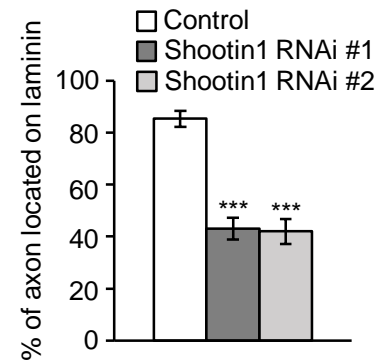
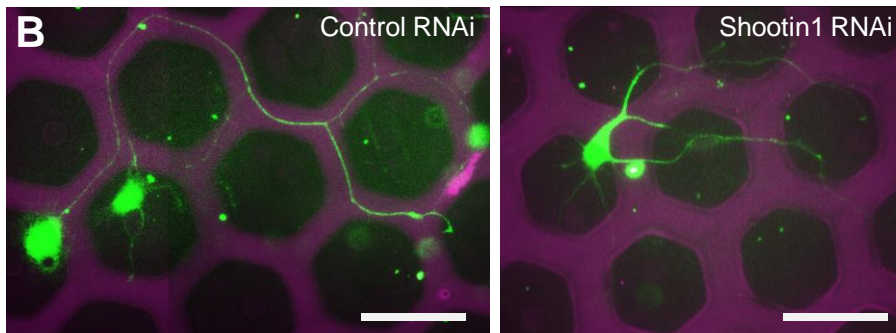
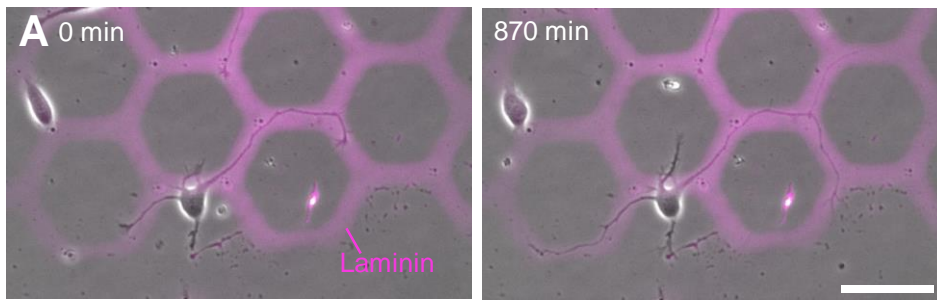


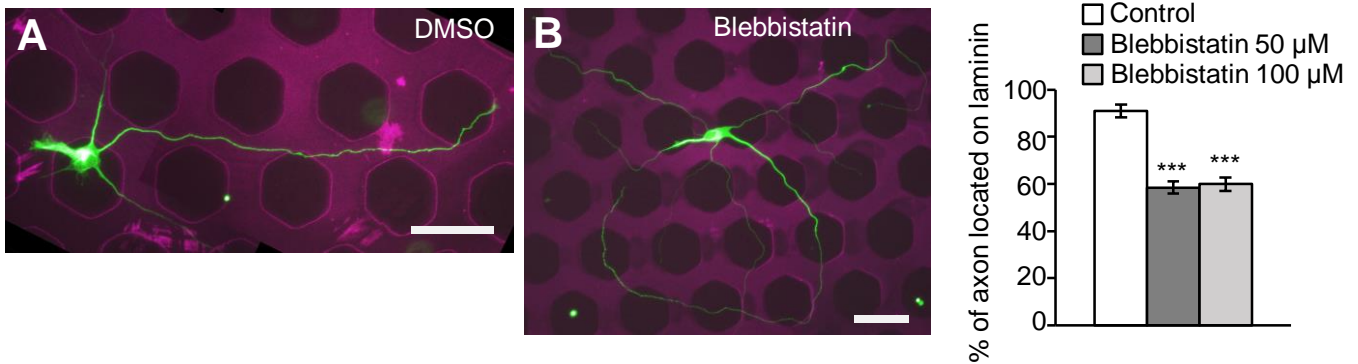
図16. ラミニン/ポリリジン境界における軸索ガイダンス機構のモデル

- (A) ラミニンによるアクチン重合の促進を介した軸索ガイダンスのモデルを示す。  
 (B) ラミニンによる線維状アクチンとL1-CAM間の連結の強化を介した軸索ガイダンスのモデルを示す。  
 (C) ラミニンもしくはポリリジン上の成長円錐におけるF-actin、Shootin1aおよびL1-CAMの予想される逆行性移動速度の変化と牽引力発生への影響及び本研究で得られたデータの傾向を示す。



### 参考資料1. 六角形状にマイクロパターン化したラミニンによる軸索ガイダンス機構

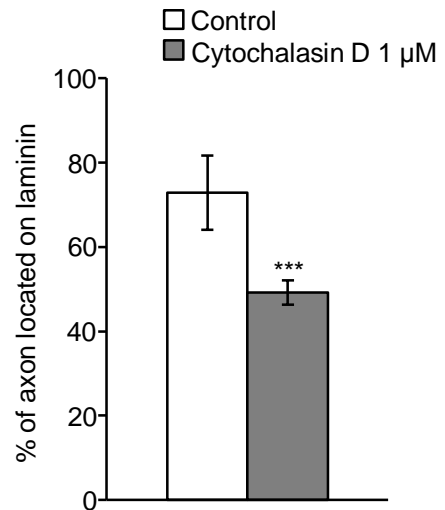
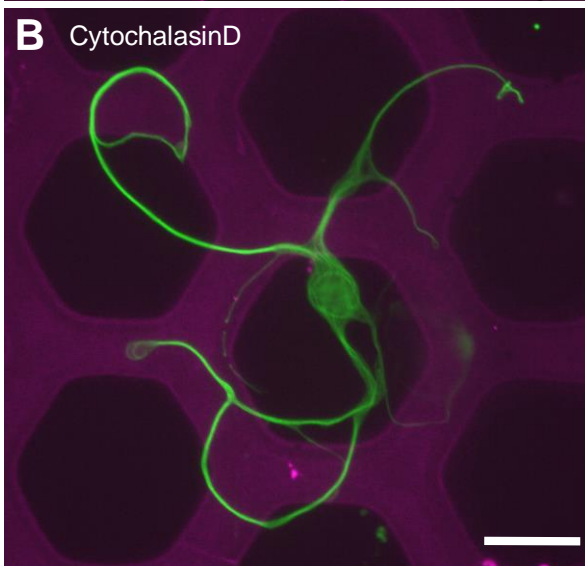
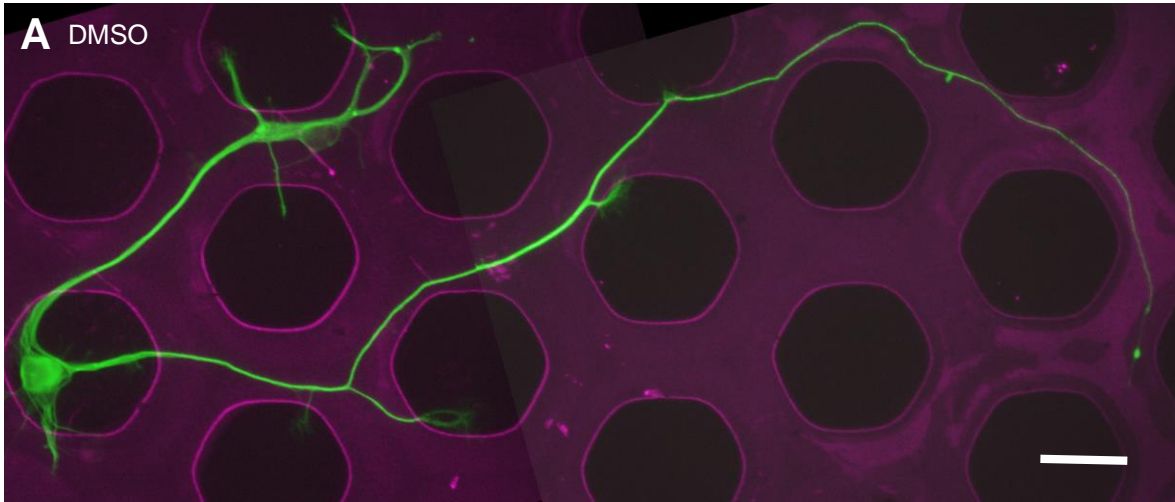
(A) 六角形状にマイクロパターン化したラミニンによる軸索ガイダンスのライブイメージング 0 min: イメージング開始時間、870min: イメージング開始後870分、ピンク: ラミニン領域、グレー: ポリリジン領域 (B) Shootin1 miRNA #1,#2 による軸索ガイダンスの阻害効果を示す。(C) Cortactin miRNA #1, #2によるラミニン上における軸索ガイダンスの阻害効果を示す。(D) L1-CAM miRNA #1, #2によるラミニン上における軸索ガイダンスの阻害効果を示す。(\*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test) Bars: 50 $\mu$ m



## 参考資料2. ミオシン II 阻害時のラミニン上における軸索ガイダンス異常

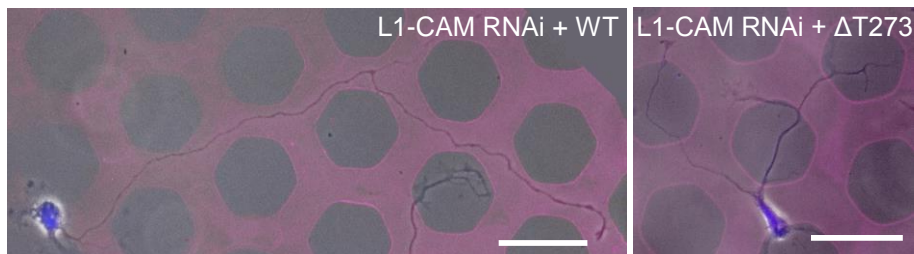
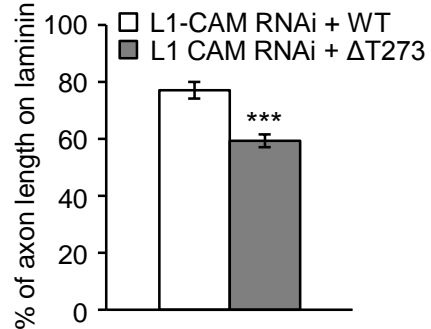
(A) DMSO を添加した場合の六角形状にマイクロパターン化したラミニン上における軸索ガイダンスを示す。(B) Blebbistatin (50, 100μM)を添加した場合の六角形状にマイクロパターン化したラミニン上における軸索ガイダンスを示す。  
 (\*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test) Bars: 50μm





**参考資料3. アクチン重合阻害によるラミニン上における軸索ガイダンス異常**

(A) DMSOを添加した場合の六角形状にマイクロパターン化したラミニン上における軸索ガイダンスを示す。(B) Cytochalasin D 1 $\mu$ Mを添加した場合のラミニン上における軸索ガイダンスを示す。グラフの縦軸はラミニンと接触した軸索の長さの割合 (%)を示す。(\*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's  $t$ -test) Bars: 50 $\mu$ m

**A****B**

#### 参考資料4. $\Delta T273$ L1-CAM変異によるラミニン上における軸索ガイダンス異常

(A) 野生型L1-CAM (WT)、 $\Delta T273$  L1-CAMを発現させた神経細胞のラミニン上における軸索ガイダンス異常を示す。(B) 野生型L1-CAM、 $\Delta T273$  L1-CAMを発現させた神経細胞のラミニン上における軸索の長さの割合 (%)を示す。 (\*\*\*,  $p < 0.01$ , Student's *t*-test) Bars : 50 $\mu$ m